

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Estudio inmunobiológico de endotoxinas bacterianas

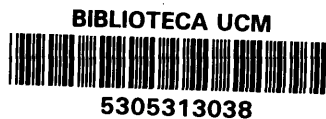
MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Isabel Barasoain Blasco

DIRECTOR:

Antonio Portoles Alonso

Madrid, 2015



T. 579.84
BAR
est

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS



ESTUDIO INMUNOBIOLOGICO DE
ENDOTOXINAS BACTERIANAS

Tesis que para aspirar al
grado de Doctor en Ciencias,
presenta,

R-20.312

MARIA ISABEL BARASOAIN BLASCO

Madrid, Junio 1976

Al finalizar esta Memoria, expreso en primer lugar mi más sincero agradecimiento al Profesor Dr. Antonio Portolés Alonso por la dirección de este trabajo, realizada con una gran entrega y dedicación, así como por la ayuda que me ha prestado en todo momento. Espero que la terminación de este trabajo le compense en parte sus desvelos.

También agradezco al Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología del C.S.I.C., en la persona de su director Prof. Dr. Lorenzo Vilas, los medios puestos a mi alcance para la realización de esta Memoria.

Asimismo expreso al Prof. Dr. Dimas Fernández Galiaño mi reconocimiento por aceptar el patrocinio de esta Memoria.

Dejo constancia de las valiosas enseñanzas y colaboración recibida del Dr. Ronda Lain y la ayuda recibida de los Drs. Bellanato y Díaz, así como del Servicio de Microscopía Electrónica y Ultracentrífuga Analítica del C.I.B.

Finalmente agradezco la ayuda recibida de todos mis compañeros de laboratorio, en especial a las Srtas. Maite Alda y M. del Carmen Jiménez por su asistencia técnica y la Srta. Marisa del Pozo por su trabajo de mecanografía de esta Memoria.

Este trabajo ha sido realizado con una Beca del III Plan de Desarrollo para la Formación del Personal Investigador.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
------------------------	---

PARTE BIBLIOGRAFICA

I. LOCALIZACION DE LAS MOLECULAS ENDOTOXICAS	3
--	---

1. <u>Membrana citoplásmica</u>	5
---	---

2. <u>Complejo de mucopéptido y lipoproteína</u>	8
--	---

3. <u>La zona periplasmica</u>	10
--	----

4. <u>Membrana externa-lipopolisacárido.</u>	11
--	----

II. AISLAMIENTO DEL LIPOPOLISACARIDO	15
--	----

1. <u>Extracción</u>	15
--------------------------------	----

2. <u>Purificación</u>	20
----------------------------------	----

3. <u>Criterios de pureza.</u>	23
--	----

III. ESTRUCTURA FISICA DEL LIPOPOLISACARIDO.	25
--	----

1. <u>Microscopía electrónica</u>	25
---	----

2. <u>Ultracentrifugación analítica</u>	37
---	----

3. <u>Cromatografía en gel</u>	44
--	----

4. <u>Heterogeneidad</u>	45
------------------------------------	----

5. <u>Espectroscopía ultravioleta e infrarroja</u>	48
--	----

IV. ESTRUCTURA QUIMICA DEL LIPOPOLISACARIDO	50
1. <u>Estructura del antígeno O</u>	54
2. <u>Estructura del nucleo basal del lipopolisacárido.</u>	65
3. <u>Estructura del lípido A</u>	72
V. ACCIONES ENDOTOXICAS	78
1. <u>Alteraciones en el mecanismos de termo-regulación</u>	79
2. <u>Reacción localizada y generalizada de Shwartzman</u> .	87
3. <u>Alteraciones vasculares, producidas por lipopolisacáridos.</u>	90
4. <u>Alteraciones hematológicas de origen endotóxico.</u> .	92
5. <u>Acción antitumoral de los LPS.</u>	97
6. <u>Interacciones endotoxina-virus</u>	99
7. <u>Cambios metabólicos y endocrinológicos</u>	104
8. <u>Resistencia inespecífica a infecciones</u>	108
9. <u>Otros efectos.</u>	109
VI. INTERACCIONES ENDOTOXICAS CON EL SISTEMA INMUNITARIO	111
1. <u>Actividad inmunogénica</u>	111
2. <u>Efecto inmuno-coadyuvante de las endotoxinas</u> . . .	119
3. <u>Interacciones endotoxina sistema complemento</u> . . .	126
4. <u>El fenómeno de tolerancia inmunológica inducido por endotoxinas</u>	139
5. <u>Sobre la inmunosupresión inducida por endotoxinas.</u>	140

VII. ACTIVIDAD MITOGENICA DE LAS ENDOTOXINAS	153
1. <u>Activación de linfocitos</u>	153
2. <u>Mecanismos desencadenantes de la proliferación linfocitaria.</u>	158
3. <u>Maduración de linfocitos y síntesis de inmunoglobulinas</u>	162
4. <u>Efecto de lipopolisacáridos sobre macrófagos</u>	168
5. <u>Correlación entre las actividades mitogénicas coadyuvantes e inmunogenicas de los lipopolisacáridos endotoxicos.</u>	171
VIII. ESTADO ACTUAL DEL TEMA	177

PARTE EXPERIMENTAL

I. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	186
II. MATERIAL Y METODOS	189
1. <u>Material y medios</u>	189
1.1. <u>Microorganismos.</u>	189
1.2. <u>Lineas tumorales</u>	189
1.3. <u>Animales de experimentación.</u>	190
1.4. <u>Medios de cultivo</u>	190
1.5. <u>Reactivos químicos</u>	194
1.6. <u>Reactivos biológicos y otros reactivos</u>	194
1.7. <u>Material de plastico y cristal para cultivos celulares.</u>	195
2. <u>Técnicas.</u>	196
2.1. <u>Métodos microbiológicos.</u>	196

2.2. <u>Métodos Bioquímicos</u>	198
2.3. <u>Métodos fisicoquímicos</u>	208
2.4. <u>Métodos biológicos</u>	212
2.5. <u>Métodos inmunobiológicos.</u>	213
III. RESULTADOS	227
1. <u>Obtención de endotoxinas.</u>	227
2. <u>Purificación</u>	227
2.1. <u>Por sedimentación</u>	232
2.2. <u>Por ultrafiltración</u>	232
2.3. <u>Cromatografía en gel.</u>	235
3. <u>Obtención de endotoxinas marcadas con isotopos</u>	244
4. <u>Control analítico y caracterización de los lipopolisacáridos obtenidos.</u>	244
4.1. <u>Espectroscopía ultravioleta</u>	247
4.2. <u>Espectros infrarrojos</u>	247
4.3. <u>Espectroscopía de resonancia magnética nuclear</u>	256
4.4. <u>Estudio de la reacción para la determinación colorimétrica del LPS</u>	258
5. <u>Morfología molecular dellipopolisacárido</u>	265
5.1. <u>Características hidrodinámicas</u>	265
5.2. <u>Estudio del LPS al microscopio electrónico.</u>	270
6. <u>Propiedades biológicas</u>	273
6.1. <u>Pirogenicidad</u>	273

6.2. <u>Toxicidad</u>	280
7. <u>Actividades inmunobiológicas</u>	284
7.1. <u>Mitogénesis</u>	284
7.2. <u>Capacidad hipersensibilizante</u>	285
7.3. <u>Inmunogénesis</u>	285
7.4. <u>Variaciones de la actividad fagocitaria</u>	303
7.5. <u>Capacidad inmunosupresora.</u>	306
7.6. <u>Transmisión de la capacidad inmunogénica.</u>	308
7.7. <u>Producción de interferón inespecífico en presencia de LPS</u>	313
7.8. <u>Efecto del LPS bacteriano sobre el crecimiento del mastocitoma P815y "in vitro".</u>	316
7.9. <u>Efecto de la indo metacina sobre la respuesta inmune frente a lipopolisacáridos de P.aeruginosa.</u>	316
IV. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS	320
1. <u>En relación con la obtención y purificación de endotoxinas</u>	320
2. <u>En cuanto a las características analíticas, fisicoquímicas y estructurales, como criterios de pureza</u>	327
3. <u>En cuanto a las actividades tóxicas observadas en los LPS de Gram-negativas</u>	339
4. <u>Sobre las endotoxinas como inmunogenos y la posibilidad de transmitir esta inmuno-respuesta específica anti-LPS</u>	342

5. <u>Sobre la inmunosupresión de carácter endotóxico a nivel celular y humoral</u>	350
6. <u>Sobre otras acciones endotóxicas de carácter inmunobiológico, mitogenesis e interacciones LPS-virus</u>	353
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.	361
VI. BIBLIOGRAFIA.	373

I N T R O D U C C I O N

De todos los metabolitos bacterianos que pueden intervenir en los mecanismos moleculares de agresión frente al huésped, las endotoxinas son posiblemente las que mas atraen la atención de los investigadores ocupados en estudiar la problemática de la patogénesis microbiana. En efecto, la compleja arquitectura macromolecular de los lipopolisacáridos y su localización en estructuras celulares periféricas -condicionante de inmunogénesis y especificidad serológica- así como sus cambiantes relaciones estructura-actividad (dependiendo de la agregación de los diferentes determinantes químicos) plantean incógnitas verdaderamente sugestivas para nosotros.

Por otra parte, en relación con las especies bacterianas objeto de este estudio, no tuvimos duda en acudir a estirpes patógenas de Pseudomonas aeruginosa por tratarse de las bacterias Gram-negativas que más problema están causando, debido a su acusada antibiotico-resistencia y quimio-resistencia, su gran versatilidad enzimática y su posible actividad inmunodepresora. Asimismo, endotoxinas de otros gérmenes Gram-negativos han sido también utilizadas, en esta Memoria, con propósitos de investigación comparativa.

Es nuestro propósito, en primer lugar, actualizar

todos aquellos datos que se refieren tanto a la localización y estructura de las moléculas endotóxicas como a su obtención y purificación, pasando después a estudiar sus actividades biológicas, las reacciones inmunitarias conocidas y su posibilidad de actuar como mitógenos. Todo ello constituirá el cuerpo de doctrina sobre el que considerar nuestros resultados experimentales en relación con algunas reacciones inmunobiológicas de moléculas endotóxicas procedentes de éstirpes patógenas del gen. Pseudomonas.

PARTE
BIBLIOGRAFICA

I. LOCALIZACION DE LAS MOLECULAS ENDOTOXICAS.

Dado que los lipopolisacaridos constituyen las principales estructuras moleculares que confieren singularidad a las envolturas celulares de eubacterias Gram-negativas, parece lógico admitir que la actualización de la problemática del tema comience por delimitar las zonas bacterianas en que se asientan las endotoxinas y cuales son sus relaciones histoquímicas con otras macromoléculas para, sucesivamente, ir deduciendo las consecuencias fisiológicas de esta organización.

Como resulta imposible localizar las moléculas endotóxicas sin hablar de las estructuras periféricas de las bacterias Gram-negativas, (Fig. 1) iremos perfilando de una manera resumida las características e interrelaciones entre las distintas capas que envuelven a la célula bacteriana. Estas se componen de distintas macromoléculas que, en ocasiones, se distribuyen de un modo discontinuo y que la confieren sus peculiares atributos fisico-químicos.

Según es sabido, el citoplasma aparece envuelto por la membrana citoplásmica, la capa de mucopeptido adosada sobre ésta última y la membrana externa, que -anclada sobre el mucopeptido- deja entre ella y la capa interna el espa-

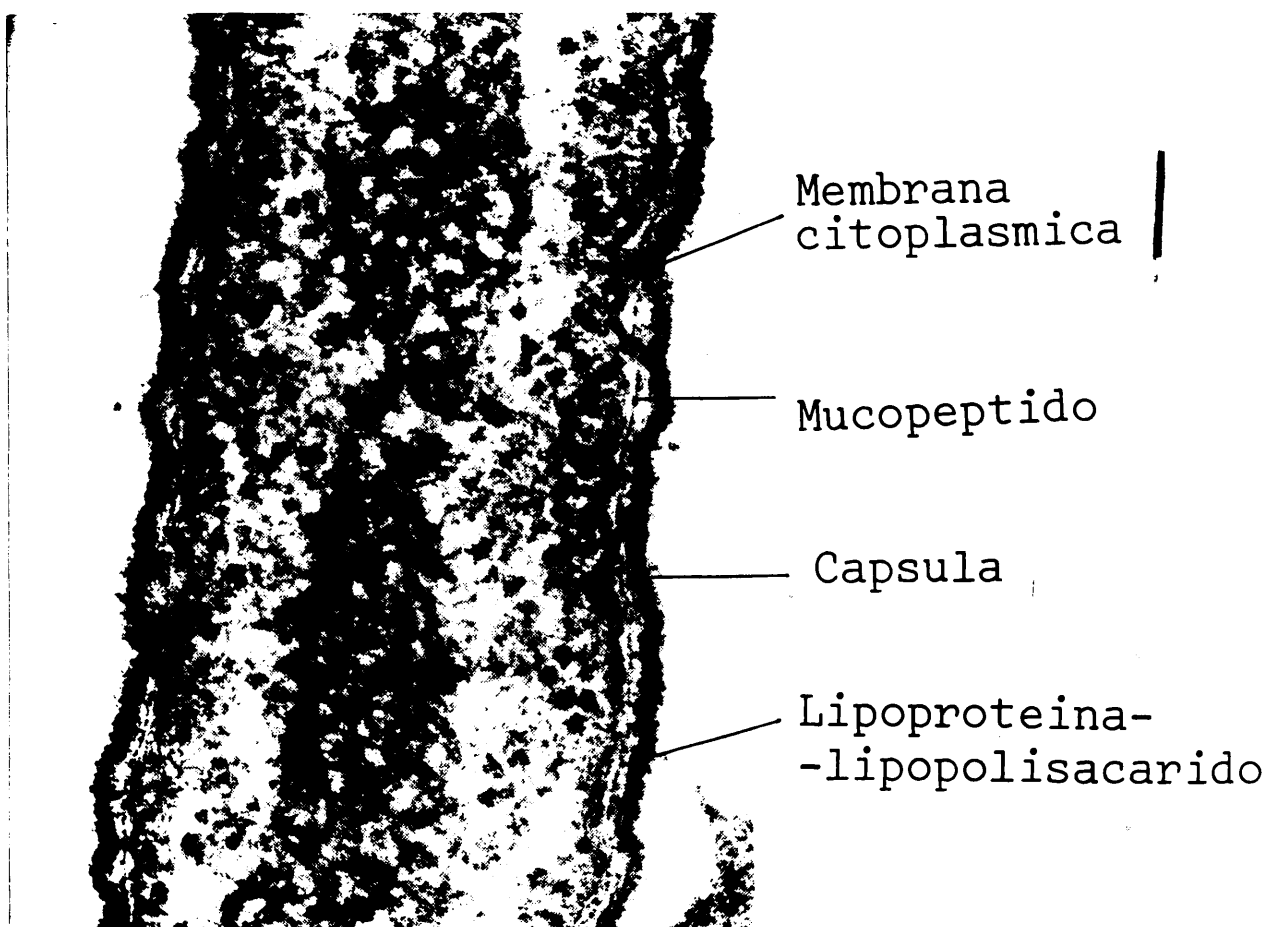


Fig. 1.- Microfotografía al microscopio electrónico de las envueltas celulares de una bacteria gram-negativa en la que se puede observar la posición ocupada por las moléculas de lipopolisacarido.

cio periplásmico.

En la Fig. 2 reproducimos un interesante diagrama propuesto por COSTERTON y cols. (1974), en el que es fácil diferenciar y localizar las distintas capas de las estructuras celulares periféricas que envuelven a las bacterias Gram-negativas. El esquema nos permite referirnos con mas facilidad a los componentes e interpretar su entramado molecular que, en definitiva, es lo que va a dar origen a sus funciones específicas. Como puede verse, tres zonas principales y un entramado de moléculas de mucopeptido, , constituyen las envolturas celulares de las bacterias Gram-negativas y de ellas hablaremos a continuación.

1.- Membrana Citoplásmica

Esta capa resulta ser una interfase vital para las envolturas celulares porque es en ella donde se sintetizan y se ensamblan los componentes de la pared bacteriana. Mediante la preparación de protoplastos, en bacterias Gram-negativas (COSTERTON, 1970), se ha conseguido el aislamiento de preparaciones puras de membrana citoplásmica, cuya composición química es similar a la de otras membranas biológicas (MARTIN y MACLEOD, 1971).

Mediante microscopía eletronica convencional (DE PETRIS, 1967; GLAUERT y THORNLEY, 1969) y por técnicas de criocorrosion (BAYER y REMSEN, 1970; NANNINGA, 1970) se han realizado estudios de su morfología y se ha comprobado que estas estructuras presentan las características correspondientes a los modelos generales de membranas (DANIELLI y DAVSON, 1935; SINGER y NICOLSON, 1972; CAPALDI y VANDERKOOI, 1972).

DETALLE DE LA
ESTRUCTURA DE
LA MEMBRANA

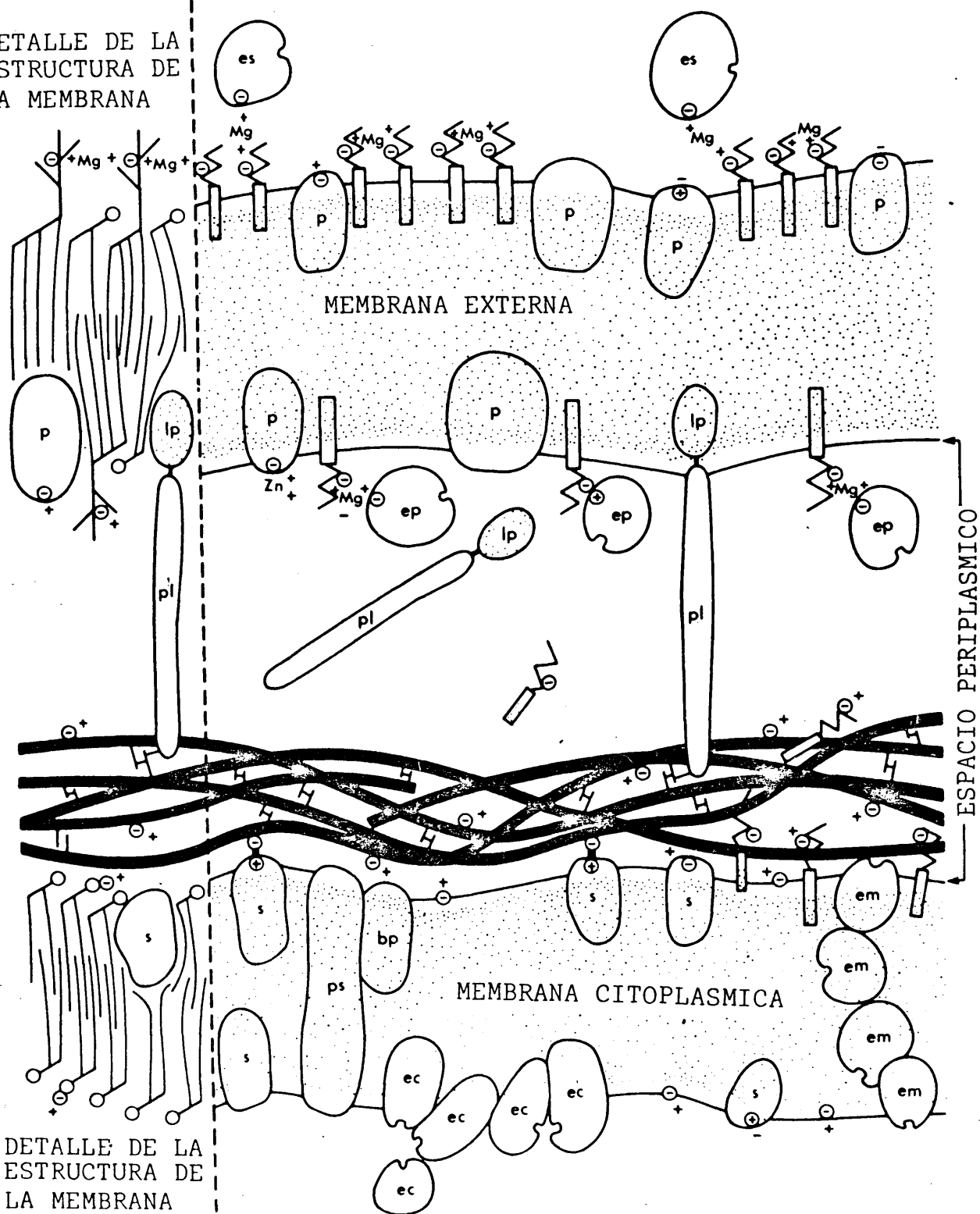








Fig. 2.- Representación esquemática de las envueltas celulares de microorganismos gram-negativos. (La explicación de los distintos elementos y estructuras se detalla en la siguiente página.

Explicación de la Fig. 2.-: +, cationes libres; -, aniones libres; ⊕ cationes ligados, ⊖ aniones ligados; Ⓢ enlaces iónicos;  zona hidrofóbica,)-(enlace covalente;  porción polipeptídica del mucopeptido;  porción polisacárida del mucopeptido; S proteína enzimáticamente activa;  fosfolípido;  lipopolisacárido;  esquema del lipopolisacárido; bp, proteína de unión; ec, enzimas asociadas con la membrana citoplasmática cuya función está dirigida al citoplasma; em, enzimas asociadas con la membrana citoplasmática que sintetizan componentes macromoleculares de la pared celular; ep, enzimas localizadas en la zona periplasmática; es, enzimas localizadas en la superficie celular; lp, porción lipídica de la lipoproteína de Braun; ps, permeasas; s, proteína estructural de la membrana citoplasmática.

Las funciones de esta membrana citoplásmica corresponden a las realizadas por biomembranas pertenecientes a orgánulos especializados (transporte, respiración, y fosforilación oxidativa, asiento de polisomas para síntesis de proteínas, etc.) mas aquellas implicadas en la síntesis y ensamblado de las capas externas de la envuelta celular, que resultan ser propias de las bacterias. En esta membrana existen enzimas capaces de sintetizar unidades de mucopeptido (ROGERS, 1970; ROGERS y PERKINS, 1968), LPS (HINCKEY y cols. 1972; MÜLLER y cols. 1972; OSBORN y cols. 1972) y fosfolípidos (BELL y cols. 1971; HINCKEY y cols. 1972; OSBORN y cols. 1972; WHITE y cols. 1971) así como ciertas proteínas de la pared que después son asimismo transportadas por esta estructura (GLEW y HEATH, 1971) como puede verse en el esquema de la Fig. 3, según COSTERTON y cols. (1974).

2.- Complejo de mucopeptido y lipoproteína

Esta capa, que se encuentra sobre la membrana citoplásmica, aparece formada por polímeros de azúcares sustituidos y entrelazados entre sí por pequeños péptidos. De este modo se origina una estructura covalente que recubre la célula y la confiere la rigidez y resistencia a la presión osmótica interna característica.

Según BRAUN y BOSCH (1972), en algunas especies de bacterias Gram-negativas, se ha encontrado una lipoproteína que aparece asociada covalentemente al mucopeptido o, en estado libre, distribuida por el espacio periplásmico. SCHNAITMAN (1971), ha supuesto que la parte lipídica de esta molécula está unida con los fosfolípidos de la membrana externa por me-

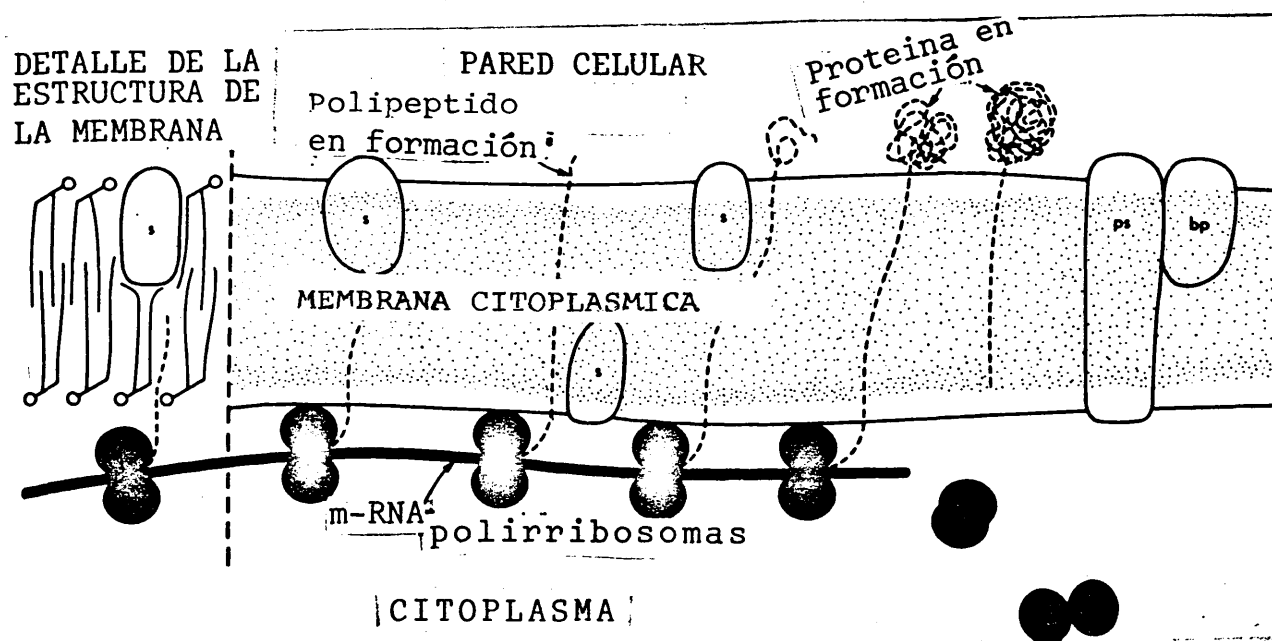





Fig. 3.- Mecanismo propuesto para la secreción de proteínas por la membrana citoplasmica. , fosfolipido; , area hidrofóbica; , cadena polipeptídica; bp, proteína de unión; ps, permeasa; s, proteína estructural de la membrana citoplasmica.

dio de interacciones hidrofóbicas y esta observación podría servir para explicar el que la membrana externa sea separable del mucopéptido por medio de enzimas proteolíticos.

Por otra parte también aparecen zonas de íntima adhesión entre la membrana citoplasmica y el complejo de mucopeptido , coincidiendo con los puntos de adsorción de fagos (BAYER, 1968), lo que permite establecer mas relaciones entre estos componentes.

3.- La zona periplásmica

El concepto de espacio periplásmico es esencialmente funcional (MITCHELL, 1961); se trata de una zona celular en la que se localizan diversas actividades enzimáticas y esta limitada de un lado, por la membrana plasmática, y por otro por la membrana externa. Las proteínas que en ella existen, con actividad enzimática, pueden estar asociadas a otros componentes de la pared celular (CHENG y cols. 1971) o bien a la parte externa de la membrana citoplásmica (HEPPEL, 1971) y también pueden resultar liberadas al medio, junto con proteínas fijadoras de ligandos y pigmentos. Esta liberación puede lograrse mediante tratamientos especiales (HEPPEL, 1971) o producirse espontáneamente, en cepas incapaces de retenerlas (LINDSAY y cols. 1973), sin que esto signifique alteraciones metabólicas ya que aún en esas condiciones pueden seguir creciendo en los medios adecuados. Así pues, el espacio periplásmico provee a la cara externa de la membrana citoplásmica de un medio modificado y enriquecido selectivamente, que contiene proteínas y polisacáridos asociados y distribuidos heterogeneamente (FORSBERG y cols. 1970 a, FORSBERG y cols. 1970 b).

4.- Membrana externa-lipopolisacarido.

Si estudiamos detenidamente, mediante microscopía electrónica las estructuras perifericas de una bacteria Gram-negativa nos encontramos una capa que parece idéntica a otras membranas biológicas -la formada por membrana externa y lipopolisacarido- en la que las proteínas y fosfolípidos de la misma están formando una bicapa que, por fijación, se desnaturaliza y aparece como un doble brazo (DREHER y cols. 1967).

Estudios recientes con esta membrana externa han demostrado que posee, además de los fosfolípidos y proteínas antes citados (FORSBERG y cols. 1970 b; OSBORN y cols. 1972; SCHNAITMAN, 1970), ciertas cantidades variables de lipopolisacarido (DE PAMPHILIS y ADLER, 1971; OSBORN y cols. 1972 a; OSBORN y cols. 1972 b; OSBORN, 1971; SCHNAITMAN, 1971). Por otra parte, sucesivos estudios biofísicos han indicado que, mientras los componentes básicos son las proteínas y fosfolípidos, el lipopolisacarido parece estar asociado a estos y queda enfrentada hacia afuera su porción azucarada por las superficies interna (CHENG y cols. 1971) y externa de esta membrana (SCHNAITMAN, 1971).

Los fosfolípidos se encuentran en cantidad parecida a los de la membrana citoplásmica de E. coli, pero son cualitativamente diferentes (WHITE y cols. 1972). Estudios de criocorrosión han demostrado que hay un plano de rotura en la membrana externa de la pared celular (DE VOE y cols. 1971; DVORAK y cols. 1970; FORGE y cols. 1973; GUILLELAND y cols. 1973 y EAGON, 1974). Ello parece indicar que las partes hidrofóbicas de los fosfolípidos y del lipopolisacárido forman una zona en

el centro de esta capa que resulta semejante a la encontrada en otras membranas. Las proteínas que la integran pueden tener una aparente función estructural (SCHNAITMAN, 1970) o bien pueden exhibir una actividad enzimática; por ejemplo, fosfolipasa (OSBORN y cols. 1972 a).

Estudios de permeabilidad efectuados sobre bacterias con defectos en la membrana externa (inducidos, por mutaciones o por tratamientos específicos) parecen indicar que -en presencia de moléculas pequeñas (actinomicina D u otros antibióticos, lisozima etc.)- se constituye una barrera selectiva o "tamiz molecular" (MITCHELL, 1961) y no actúa como un lugar de transporte activo. La permeabilidad depende en gran forma de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos (McELHANEY y cols. 1973; ROSEN y HACKETTE, 1972).

Es interesante señalar la intervención del lipopolisacárido en problemas de permeabilidad celular, donde resulta ser un constituyente muy importante, ya que por ejemplo: los mutantes rugosos de Salmonella typhimurium, que solamente se diferencian de la cepa salvaje en que tienen las cadenas antigénicas de polisacárido mas cortas, tienen una mayor permeabilidad frente a los antibióticos y a la lisozima (SANDERSON y cols. 1974) y un mayor desprendimiento de enzimas periplásmicos durante el crecimiento (LINDSAY y cols. 1973).

OSBORN (1971) ha sugerido que la asociación del lipido A del lipopolisacárido, con la zona hidrófoba de esta membrana, puede facilitar la transferencia del lipopolisacárido recién sintetizado desde la cara interior a la exterior, de esta capa, después de su desplazamiento por la membrana cito-

plásmica donde se inicia su síntesis.

El lipopolisacárido ha podido ser perfectamente visualizado, por microscopía electrónica, en la cara externa, interna e intermedia de la membrana exterior utilizando anticuerpos anti-lipopolisacarido unidos a ferritina (SHANDS, 1966). MUHLRADT y cols. (1974), haciendo uso de este mismo ensayo presenta evidencia de la movilidad lateral del lipopolisacarido en la membrana externa, así como su dependencia de la temperatura. También determinan la densidad de las moléculas de lipopolisacárido en la superficie bacteriana. Mas recientemente, MÜHLRADT y GOLECKI (1975), sugieren que el lipopolisacárido se encuentra principalmente en la parte exterior de la membrana externa, y que su distribución en ambas partes puede variar dependiendo de las manipulaciones que precedan al marcado con anticuerpos-ferritina (p. ej. temperatura). Concluyen finalmente que hay un movimiento a través de la membrana externa, quizás por una inversión de la molécula de lipopolisacárido. Los cationes divalentes también son importantes en la estabilidad y unión del lipopolisacarido a este area de la pared celular, produciendose interacciones ionicas mediadas por estos cationes entre las porciones polares de las moléculas adyacentes. En los mutantes rugosos, la delección de la parte distal de la cadena de polisacarido, acorta estas proyecciones polares y alteran tanto el grosor como el entrecruzamiento de esta barrera.

Las estirpes lisas de estas bacterias Gram-negativas pueden resultar protegidas de la lisis al reaccionar con anticuerpos y complemento a una cierta distancia de la membrana externa (REYNOLDS y PRUUL, 1971) e igualmente se protegen del

daño causado por el complemento sólo (WILSON y SPITZNAGEL, 1968), mientras que en las rugosas esto no sucede (FEINGOLD y cols, 1968), ya que su pared celular resulta alterada y también, finalmente, su membrana citoplásmica con la subsiguiente lisis. Las estirpes lisas al ser tratadas con ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), con Tris-hidroximetil-amino-metano, o con ambos, también se hacen sensibles a sueros inmuno-específicos (REYNOLDS y PRUUL, 1971) y después de que se altere la capa protectora del lipopolisacárido por polimixina (PRUUL y REYNOLDS, 1972).

El lipopolisacárido actúa como receptor de fagos en bacterias Gram-negativas (LINDBERG y HELLERQUIST, 1971) y esta especificidad reside en los azúcares terminales de la molécula.

Resumiendo, esta capa constituye una barrera hidrofóbica de la pared celular externa, y está anclada a una distancia fija de la membrana citoplásmica por moléculas de lipoproteína.

Además, de todo esto, algunas bacterias acuáticas y otras del rumen, tienen otra capa externa de carbohidratos (CHENG y COSTERTON, 1973) como se ha podido ver por tinción con rojo de rutenio y criocorrosión. Estas capas también han sido encontradas en algunas especies de Myxobacterium (PATE y ORDAL (1967)). Otras bacterias pueden poseer una envuelta externa proteica, tal como el Spirillum serpens (BUCKMIRE y MURRAY, 1970, 1973). La principal función de esta capa es la de proteger a las bacterias en medios y condiciones adversas; en el caso citado, la capa proteica puede protegerle del ataque del *Bdellovibrio* (BUCKMIRE, 1971).

II. AISLAMIENTO DEL LIPOPOLISACARIDO

Hasta aquí hemos visto la localización de las moléculas endotóxicas y qué papel representan en las estructuras periféricas de algunas células procariontes, lógicamente un paso sucesivo en su estudio teórico será conocer los distintos métodos de aislamiento, que en el presente capítulo vamos a resumir teniendo en cuenta los distintos apartados que cabe diferenciar de acuerdo con la extracción, purificación y análisis del grado de pureza.

1.- Extracción

La ruptura de la interacción del lipopolisacarido con la membrana externa y la consiguiente solubilización de éste se consigue fundamentalmente mediante la utilización de disolventes, quelantes de cationes divalentes, detergentes, alta fuerza iónica, o agentes caotrópicos.

Ya en el siglo pasado, PANUM (1859) -dejando autolizar cultivos bacterianos- observó la liberación de sustancias endotóxicas al medio. Algo más tarde CENTANNI (1894), con el mismo fin, utilizaba agua a 60° C. De hecho, actualmente se

ha llegado a observar la liberación espontánea de lipopolisacáridos bacterianos, al medio, dependiendo de las condiciones de crecimiento (KNOX y cols. 1966).

Los primeros procedimientos de extracción diferencial se deben a BOIVIN y cols. (1933), quienes utilizaron ácido tricloroacético 0.25 M a 4° C. Este método da lugar al aislamiento del antígeno O, que contiene lipopolisacárido, proteína y lípido. Este tipo de extracción se aplica, habitualmente, a estirpes bacterianas de carácter liso, ya enteras o a sus envueltas celulares aisladas (BOIVIN y MESROBEANU, 1935, STAUB, 1965, TSANG y cols. 1974), mientras que un procedimiento de extracción mas suave, con dietilenglicol, (MORGAN, 1937, MORGAN y PARTRIDGE 1942) o con 50% de piridina o glicol (GOEBEL y cols. 1945, BAKER y cols. 1949) es empleado frente a un número mas restringido de estirpes en las que esta extracción ha de ser mas delicada.

PALMER y GERLOUGH (1940) -para la extracción de sustancias endotóxicas- introdujeron una técnica en la que se emplea fenol al 95%. Sin embargo, el procedimiento mas extendido de extracción de los lipopolisacáridos bacterianos, tanto de estirpes lisas como rugosas, es el de fenol-agua al 45% (WESTPHAL y cols. 1952, WESTPHAL y JANN, 1965). Este método se puede aplicar a partir de células enteras (FENSOM y GRAY, 1969, HARTLEY y cols. 1974, MORRISON y LEIVE, 1975) o también utilizando tan solo las envueltas celulares (HOLME y cols. 1968, FENSOM y GRAY, 1969; FULLER y cols. 1973; HOLLINGDALE, 1975). Usando este procedimiento, en la fase acuosa se obtiene además del lipopolisacárido, antígeno O y ácidos nucleicos. También, en algunas bacterias Gram-negativas, se extraen así antígenos cap-

sulares tales como el K y el Vi ó un ácido colánico (GOEBEL, 1963) todos ellos, por lo general, son polisacáridos ácidos (LUDERITZ y cols. 1968).

Si las bacterias se tratan previamente con tricloroacético, antes de la extracción con fenol, no existe contaminación de ácidos nucleicos (O'NEILL y TODD, 1961); y resultados semejantes se obtienen cuando las bacterias se tratan previamente con formaldehído.

Este método de extracción del lipopolisacárido con fenol-agua se ha ensayado con éxito frente a muchas especies de bacterias tales como las indicadas a continuación y cuya referencia se incluye para aquellos interesados específicamente en el tema: Brucella abortus y B. melitensis (RENOUX y cols. 1973), Coxiella burneti (BACA y PARETSKY, 1974), Rhodopseudomonas viridis (WECKESSER y DREWS, 1974), Thiobacillus ferrooxidans (VESTAL y cols. 1973), Vibrio cholerae (GUHATHAKURTA y DUTTA, 1974), Yersinia pseudotuberculosis (SAMUELSSON y cols. 1974), Yersinia pestis (HARTLEY y cols. 1974), Bacteroides melanogenicus, Fusobacterium fragilis y Sphaerophorus necrophorus (HOFSTAD y cols. 1972), Myxococcus fulvus (ROSENFELDER y cols. 1974), Neisseria meningitidis (JENNINGS y cols. 1973), Rhizobium trifolii (RUSSA y LORKIEWICZ, 1974), Pseudomonas diminuta, P. pavonaceae, P. rubescens, P. stutzeri y P. synchyanea (WILKINSON y cols. 1973), P. alcaligenes (KEY y cols. 1970), Salmonella typhi (RAYNAUD y cols. 1973) y Salmonella newington (RYAN y CONRAD, 1974). MAYBERRY-CARSON (1974) utilizan este método para la extracción del lipopolisacárido de un Mycoplasma del Thermoplasma acidophilum.

Todos estos autores, anteriormente citados, extraían el lipopolisacárido casi exclusivamente de la fase acuosa; sin embargo HICKMAN y ASHWELL (1966), RAFF y WHEAT (1968) y KASAI y NOWOTNY (1967) al estudiar, respectivamente, algunas cepas de Xanthomonas campestris, Citrobacter y un mutante rugoso sin heptosas de Salmonella minnesota, encontraron que los lipopolisacáridos correspondientes se obtenían casi exclusivamente de la fase fenólica y no de la acuosa. Quizá sea de interés señalar, en este caso, una característica común de estos lipopolisacáridos, como es su marcada naturaleza lipofílica condicionada por su alto contenido en N-acetilaminodeoxihexosas (X. campestris y Citrobacter) o por el gran contenido de lípido A (70% en el caso de un mutante R) y a ello se puede deber su anómala distribución entre el fenol y el agua. También, más recientemente, extraerían lipopolisacáridos específicamente de la fase fenólica, otros autores como LEONG y cols. (1970) usando B. abortus, B. melitensis y B. suis; HURVELL (1973) con B. abortus y Yersinia enterocolitica; WECKESSER y cols. (1973) con Rhodopseudomonas palustris; DENEKE y COLWELL (1973) con Vibrio marinus, y WECKESSER y cols. (1974) con Anabaena variabilis (un alga filamentosa azul-verdosa).

Por otra parte, para la extracción de lipopolisacárido de mutantes rugosos y de glicolípidos, GALANOS y cols. (1969), han desarrollado un método que consiste en el tratamiento de bacterias secas con una mezcla de fenol, cloroformo y éter a 10-20° C. Estas preparaciones, solubles en agua, tienen una baja contaminación de proteínas y ácidos nucleicos. El procedimiento ha sido aplicado para la extracción del lipopolisacárido de E. coli K-12 (BOMAN y MONNER, 1975), Salmonella T2 (BRUNETEAU y cols. (1974), S. typhi R2 (RAYNAUD y cols. 1973) y Vibrio

marinus (DENEKE y COLWELL, 1973) entre muchos otros.

También RIBI y cols. (1959, 1961, 1964) introdujeron un metodo de aislamiento de lipopolisacáridos mediante extracción en mezclas eter-agua. El lipopolisacarido así obtenido se diferencia del extraído mediante fenol-agua, en que tiene menos lípido firmemente unido, aunque la actividad biológica de ambos resulta semejante. Este procedimiento se ha utilizado con éxito en la obtención del lipopolisacarido de B. abortus (FOSTER y RIBI, 1962, LEONG y cols. 1968) y B. canis y B. suis (BOWSER y cols. 1974).

Otros métodos de extracción basados también, como los anteriores, en las características diferenciales de solubilidad del lipopolisacárido son el de extracción con butanol-agua de MORRISON y LEIVE (1975) con el que se han obtenido buenos rendimientos en Escherichia coli.

Finalmente, otros tipos de técnicas han sido usadas para la obtención de lipopolisacaridos; entre ellos la de WALKER (1940), utilizando un agente caotropico para la extracción del lipopolisacarido (urea 2.5 molar) y la de ADAMS (1967), con dimetilsulfoxido caliente, aplicada para la extracción de estas substancias a partir de bacterias completas y de envueltas celulares aisladas. El contenido de azúcares y acidos grasos del lipopolisacárido así conseguido era similar al obtenido mediante extracción con fenol-agua.

Otro grupo de investigadores (RAYNAUD y cols. 1949, 1973) han utilizado una alta fuerza ionica, como la mezcla de cloruro sodico 1 M - citrato sódico 0.1 M, para obtener endoto-

xina, a partir de Salmonella typhi, S. typhi R2 y S. minnesota R595 y después hacen un estudio comparativo de las endotoxinas extraídas por este método, con aquellas obtenidas por otros procedimientos.

También se han utilizado agentes quelantes de cationes divalentes (etilen-diamino-tetraacético) para separar el lipopolisacárido de la membrana externa de Ps. aeruginosa (ROGERS y cols. 1969), de S. enteritidis (CHIPLEY, 1974) y de E. coli (LEIVE, 1965, LEIVE y cols. 1968), rompiendo la estabilidad entre las posibles interacciones iónicas mediadas por Mg^{++} . NOWOTNY y cols. (1963) utilizaron, con este mismo propósito un detergente catiónico como el Bromuro de cetiltrimetil-amonio.

2.- Purificación

Los procedimientos de purificación de extractos crudos de lipopolisacárido se basan principalmente en precipitaciones selectivas, separación por tamaño molecular y degradación de contaminantes por tratamiento con enzimas hidrolíticos específicos.

Un procedimiento de purificación bastante extendido y que se utiliza después de diferentes métodos de extracción, es el de precipitación con etanol o metanol (PANUM, 1859, CENNANI, 1894, RAISTRICK y TOPLEY, 1934, MORGAN, 1937, PALMER y GERLOUGH, 1940, WALKER, 1940, GOEBEL y cols. 1945, WESTPHAL y cols. 1952, DAVIES, 1956, RIBI y cols. 1959, NOWOTNY y cols. 1963, HOMMA y ABE, 1972, RENOUX y cols. 1973, HURVELL, 1973). Asimismo, con idéntico fundamento, se ha utilizado la precipitación con acetona del lipopolisacárido (MORGAN, 1937, PALMER y GERLOUGH, 1940, WALKER, 1940, ADAMS, 1967, TSANG y cols.

1974, BOMAN y MONNER, 1975, STEAD y cols. 1975). Por otra parte, MILES y PIRIE (1939) emplearon $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ para precipitar la endotoxina, mientras que CHERMANN y cols. 1967, RAYNAUD y cols. 1973 purifican lipopolisacaridos mediante precipitación con polietilenglicol. Un metodo que resulta original es el de OSBORN, 1963, quien para la purificación de lipopolisacaridos de mutantes rugosos utiliza la precipitación de estas moléculas por iones magnesio, pero su empleo parece muy restringido.

De todos los métodos consultados el que resulta mas extendido es el de sedimentación de los extractos crudos en ultracentrifuga (WESTPHAL y cols. 1952). Consiste en ultracentrifugación de las muestras -a 105.000 xg durante 3 horas- el sedimento resultante se vuelve a resuspender en agua y es centrifugado otra vez en idénticas condiciones. En el sobrenadante quedan los ácidos nucleicos, y otros polisacáridos. Este método se ha seguido utilizando sucesivamente con muy distintos lipopolisacáridos bacterianos como se puede ver por la extensa bibliografía consultada (FENSOM y GRAY, 1969, KEY y cols. 1970, FULLER y cols. 1973, JENNINGS y cols. 1973, VESTAL y cols. 1973, WECKESSER y cols. 1973, WILKINSON y cols. 1973, HARTLEY y cols, 1974, WECKESSER y DREWS, 1974, BACA y PARETSKY, 1974, SAMUELSSON y cols. 1974, TSANG y cols. 1974, BRUNETEAU y cols. 1974, WECKESSER y cols. 1974, RUSSA y LORKIEWICZ, 1974, PREHM y cols. 1975, OKUDA y cols. 1975, STEAD y cols. 1975, HIRT y ROBIE, 1975, BOMAN y MONNER, 1975

Un perfeccionamiento del metodo ha sido propuesto por ØRSKOV y cols. (1963), quienes utilizaron el bromuro de cetiltrimetilamonio (detergente catiónico) al 0.2% para precipitar, del sedimento obtenido por ultracentrifugación del lipopolisacarido crudo, los residuos de acidos nucleicos y polisacaridos acidos contaminantes. Este procedimiento ha sido utilizado mas recientemente por RAYNAUD y cols. (1973) y GUHATHAKURTA y DUTTA (1974).

En ocasiones se realiza una digestion previa del extracto crudo con enzimas hidroliticos como pronasa (RAYNAUD y cols. 1973, MORRISON y LEIVE, 1975, OKUDA y cols. 1975) o distintas nucleasas (HOFSTAD y cols. 1972, HURVELL, 1973, RYAN y CONRAD, 1974, SUGIYAMA y cols. 1974, HARTLEY y cols. 1974, STEAD y cols. 1975, OKUDA y cols. 1975). A continuación sigue la ultracentrifugación o bien se aplica una separación de los productos de digestión mediante dialisis; o mejor aún, por lavado a través de ultrafiltros diaflo XM 100 (RUBIO y LOPEZ, 1972, MORRISON y LEIVE, 1975).

Finalmente, se ha utilizado también la cromatografia sobre gel en columna para conseguir una separación -por tamaños moleculares- del lipopolisacárido, acidos nucleicos y otros contaminantes de menor tamaño. En este sentido ROGERS y cols. (1969) por una parte y HANNECART-POKORNI y cols. (1970) por otra, han utilizado Sephadex G-200 y practicando la elución del lipopolisacarido (en ambos casos) en el volumen de exclusión. Asimismo se han purificado lipopolisacáridos por filtración a través de Sepharosa 2 B (ROMANOWSKA, 1970, RUSSA y LORKIEWICZ 1974, HIRT y ROBIE, 1975), Sepharosa 4B (ROMANOWSKA, 1970,

CHERMANN y cols. 1971, RUBIO y LOPEZ, 1971, HARTLEY y cols. 1974, TSANG y cols. 1974, MORRISON y LEIVE, 1975) y Sepharosa 6B (JENNINGS y cols. 1973). Otros autores han utilizado columnas de bolas de cristal CPG-10-2000 A (SUGIYAMA y cols. 1974).

3.- Criterios de pureza

La falta de una definición precisa que limite las características estructurales de una endotoxina y el que no existan criterios de pureza de caracter normalizado dificulta mucho el estudio de la estructura de los lipopolisacáridos. Hasta ahora el criterio de pureza utilizado con mas frecuencia ha sido la ausencia de contaminación con materiales citoplásmicos, tales como ácidos nucleicos, pero este criterio deja bastante que desear y por eso en ocasiones se ha acudido a estudiar la homogeneidad por cromatografía en gel y a su analisis inmunolectroforetico (JENNINGS y cols. 1973).

También algunos autores han utilizado la actividad biologica como un criterio de pureza, pero ésta puede presentar una gran variabilidad.

Para lipopolisacáridos procedentes de mutantes sin heptosas, se ha usado como criterio de pureza la cromatografía en capa fina y de intercambio de iones (KASAI y NOWOTNY, 1967, ROONEY y GOLDFINE, 1972).

En este sentido BOMAN y MONNER (1975) sugieren que la cromatografía de lipopolisacáridos, sobre papel, puede también utilizarse con propósitos de conocer el grado de pureza.

Bajo un punto de vista crítico estas pruebas de pureza no parecen muy consistentes, sobre todo cuando suele presentarse heterogeneidad en los propios parámetros físicos de las preparaciones como veremos mas adelante.



III. ESTRUCTURA FISICA DEL LIPOPOLISACARIDO

Para ir profundizando en las propiedades de las endotoxinas se hace preciso empezar por conocer la estructura física de sus moléculas, lo que nos permitirá ir caracterizando a los diferentes lipopolisacáridos. Con este propósito se han aplicado varias técnicas de uso común en el estudio del tamaño, forma y homogeneidad de las distintas macromoléculas biológicas; para ello se ha acudido a estudios de espectroscopía, electromicroscopía y ultracentrifugación analítica, de cuyos datos damos idea a continuación.

1.- Microscopía electronica

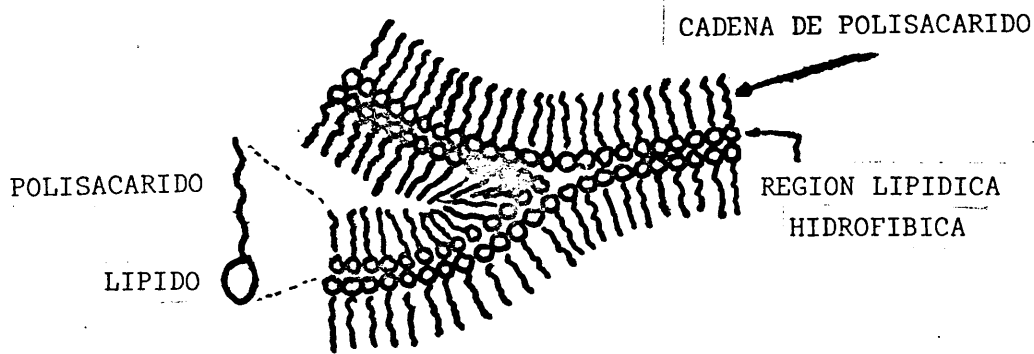
Hace casi un cuarto de siglo que SCHRAMM y cols. (1952) encontraron, por electromicroscopía, dos aspectos morfológicos completamente distintos para el lipopolisacárido aislado de E. coli; a pH neutro, este lipopolisacarido aparecía bajo la forma de gotas de unos 100 Å, mientras que a pH básico se producían largas cintas. En un estudio posterior con lipopolisacarido de este mismo E. coli (WEIDEL y cols. 1960) y con el de Bordetella pertussis (MILNER y cols. 1963) fue observada una morfología similar; sin embargo BEER y cols. (1966) encontraron que, en el lipopolisacárido de

E. coli, cuando se extraía con ácido tricloroacético, aparecían diversidad de formas (aspecto de disco, filamentos, gotas, etc.).

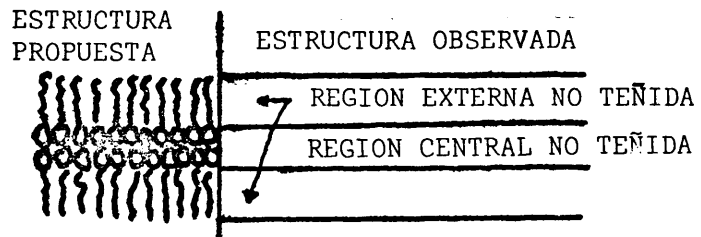
Esta variabilidad ha llevado a MILNER y cols. (1963) a sugerir que el aspecto morfológico del lipopolisacárido es la consecuencia de que se trata de un agregado micelar de subunidades de lipopolisacárido lineales que pueden orientarse de distinta forma según las circunstancias. Sin embargo, ROTHFIELD y cols. (1966, 1967) encontraron evidencia, al microscopio electrónico, de que las moléculas de lipopolisacárido aparecían incluidas en algo semejante a una bicapa y así, estos autores, sugirieron que el lipopolisacárido estaba formando una estructura bimolecular ordenada.

Este modelo viene expresado en la figura 4 y fue utilizado por LOPES e INISS (1970) para explicar la estructura del lipopolisacárido de una cepa aviar de E. coli 018. El ácido fosfotúngstico utilizado en la tinción negativa no penetra en la parte central hidrofóbica, mientras que puede quedar algo atrapado entre las cadenas laterales del lipopolisacárido dando lugar a una zona ligeramente teñida a ambos lados de la zona central.

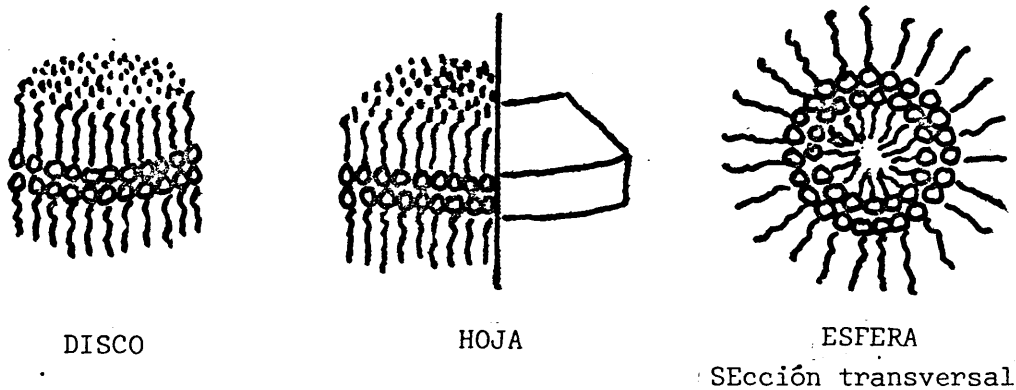
Por otra parte, SHANDS y cols. (1967) estudiaron la morfología del lipopolisacárido extraído de las paredes celulares de diferentes cepas de Salmonella typhimurium por el procedimiento de fenol-agua. Las bacterias utilizadas fueron: a) una cepa salvaje cuyo lipopolisacárido posee lipido A, polisacárido central y cadenas laterales de antigenicidad 0; b) una cepa mutante (RII TV119), cuyo lipopolisacárido está compuesto de lipido A y de polisacárido central, pero que carece de las cadenas



ENSAMBLAJE DE MOLECULAS DE LIPOPOLISACARIDO
PARA FORMAR UNA ESTRUCTURA EN FORMA DE CINTA



RELACION DEL MODELO PROPUESTO CON LA ESTRUCTURA
OBSERVADA DESPUES DE TINCION NEGATIVA



MODELO DE ENSAMBLAJE DE LAS UNIDADES DE LPS PARA FORMAR
DIVERSAS ESTRUCTURAS

Fig. 4.- Representación esquemática del LPS al microscopio electrónico propuesta por ROTHFIELD

laterales de especificidad; y c) la cepa SL1102, un mutante sin heptosas, que esta compuesto casi exclusivamente del lípido A. En el lipopolisacárido de esta cepa el ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico (KDO) es el único azucar detectable (LUDERITZ y cols. 1966).

El lipopolisacarido de la cepa salvaje, cuando se tiñe positivamente con acetato de uranilo, aparece como cintas planas, de 160 \AA de diametro. La estructura es lineal con ramificaciones. Varias manipulaciones (ultrasonidos y reacción con anticuerpos antiantígeno, marcados con ferritina) indican que el lipopolisacárido forma un polimero trilaminar, y el que no aparezca como tal -en algunas ocasiones- es debido a su tendencia a quedar orientado horizontalmente. El lipopolisacárido de la cepa mutante TVII0 tiene una apariencia y dimensiones similares a aquellas de la estirpe salvaje excepto por su tendencia a agregarse y porque las estructuras trilaminares se yuxtaponen. El lipopolisacárido de la cepa SL1102 aparece, ya como vesículas formadas de láminas, ya como estructuras trilaminares. Observaciones parecidas a estas han sido efectuadas por otros autores con lipopolisacáridos derivados de diferentes bacterias Gram-negativas (BLADEN y cols. 1967; KNOX y cols. 1967; BURGE y DRAPER, 1967); ello hace suponer que esta estructura trilaminar es bastante general entre los lipopolisacáridos de muchas especies bacterianas.

También, por otra parte, SHANDS y cols. (1967), DE PETRIS (1967) y BURGE y DRAPER (1967) han sugerido que, en medio acuoso, el lipopolisacarido existe como una bicapa. Las bases para tal conclusión estan apoyadas en consideraciones

teóricas y en la similitud que existe entre ciertas preparaciones de lipopolisacárido y las láminas de fosfolípidos. La existencia del paralelismo entre ambos tipos de sustancias resulta obvia, ya que ambas moléculas son anfipáticas y en medio acuoso orientan sus residuos polares y no polares de tal forma que los últimos se escapan del agua mientras que los primeros permanecen en ella. Para el lipopolisacárido, tal comportamiento puede dar lugar a la formación de bicapas con el lípido en el centro y con polisacáridos en ambas partes. Con ello, el lipopolisacárido tendría, por lo tanto, una estructura similar a la de los fosfolípidos dando lugar a las imágenes trilaminares del microscopio electrónico. La Figura 5 muestra el modelo de estructura trilaminar propuesto por SHANDS y cols. (1967) para el lipopolisacárido de S. typhimurium.

Hay algunos datos que son consistentes con el modelo propuesto y dan apoyo a estas consideraciones teóricas. Primeramente, la estabilidad de una suspensión acuosa de lipopolisacárido parece estar directamente relacionada con su contenido en polisacáridos, sugiriendo que esta porción molecular está verdaderamente en la fase acuosa, y en segundo lugar, marcando con anticuerpos conjugados con ferritina los polisacáridos del antígeno 0, se ve que estos se localizan en la parte externa de la cinta. Estas observaciones parecen indicar claramente que el polisacárido está en la superficie de la partícula, pero tan solo podemos suponer que el lípido está en el interior ya que no encontramos pruebas directas para fijar su localización estructural.

Precisando un poco más, y admitiendo a la estructura trilaminar, BURGE y DRAPER (1967), propusieron para el lipopo-

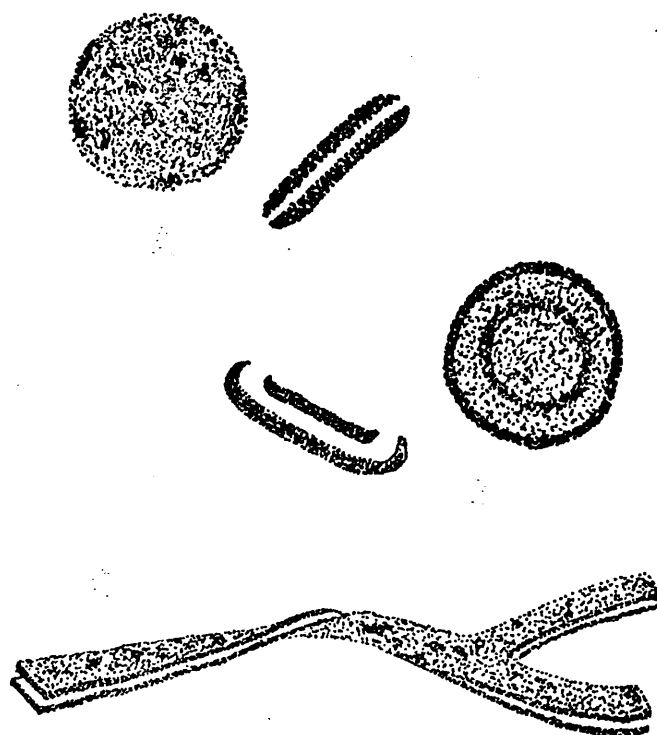


Fig. 5.- Modelo en bicapa propuesto por SHANDS para el LPS

lisacárido de Proteus vulgaris unas dimensiones de 70 Å de anchura y teniendo, además, unos 15 Å, de polisacarido, que se sitúan a ambos lados. SHANDS y cols. (1967), comparando las dimensiones del lipopolisacárido de la cepa salvaje de S. typhimurium con el de cepas deficientes en polisacarido, sugirieron que la estructura trilaminar consiste en una bicapa lipídica en la que el polisacárido central de la molécula contribuye a las líneas densas externas y que el polisacárido O no formaría parte de la estructura visible, sino que se extiende a partir de ella. Además, en el mutante sin heptosas, estas estructuras tienen 60 Å de anchura, mientras que en la estirpe salvaje y el mutante RII aparecen más anchas y llegando hasta 90 Å. Actualmente, para el lipopolisacarido derivado de S. typhimurium se admite que el lípido ocupa unos 40 Å y unos 15 Å a cada parte ocupado por el polisacarido central.

El examen al microscopio electrónico de lipopolisacáridos de distintos microorganismos muestra que existen unas similitudes morfológicas muy grandes entre ellos teniendo todos forma acintada y medidas de 50-90 Å de ancho. Así se ha comprobado en diferentes estirpes de E. coli (BEER y cols. 1966, LOPES e INISS, 1970; McINTIRE y cols. 1967; MERGENHAGEN y cols. 1966; RIBI y cols. 1966; RUDBACH y cols. 1966; WEIDEL y cols. 1960), Salmonella typhimurium (ROTHFIELD y HORNE, 1967, SHANDS y cols. 1967; LOPES e INISS, 1970), Treponema pallidum (JACKSON y ZEY, 1973), Bordetella pertussis (RIBI y cols. 1966), Yersinia pestis (HARTLEY y cols. 1974) y Thermoplasma acidophilum (MAYBERRY-CARSON y cols. 1975).

En cuanto al tratamiento de estos lipopolisacáridos, con detergentes se ha comprobado que los disgrega en subunidades mas pequeñas, debido a que se desplazan las interacciones hidrofóbicas que entre ellos existen. Así OROSZLAN y MORA (1963) ponen de manifiesto que el tratamiento de la endotoxina de Serratia marcescens con el detergente dodecil-sulfato-sódico (SDS) disocia las partículas en subunidades que carecen de poder antitumoral. Sin embargo, al retirar el detergente, las subunidades se reagregan de nuevo en partículas tóxicas. Estos estudios dieron lugar a una relación entre el tamaño y actividad biológica del polímero de endotoxina. Así, RIBI y cols. (1966), disgregaron en subunidades las endotoxinas procedentes de enterobacterias tales como Salmonella enteritidis (obtenida por el método del eter-agua), de dos estirpes de E. coli 0113 y 0111: B 4 y una Bordetella pertussis (extraídos con fenol-agua). La endotoxina del E. coli 0111: B4, al microscopio electrónico, presentó un aspecto heterogéneo de largos filamentos, otros filamentos mas cortos y algunas formas esféricas. Cuando la trataron con deoxicolato sodico al 2%, los filamentos se disociaron en elementos que no se podian distinguir al microscopio electrónico. Sin embargo, al retirar el deoxicolato sodico por dialisis, se volvieron a reasociar los componentes en polimeros con forma filamentosa, adquiriendo una longitud quizá algo menor que la endotoxina original (300 a 600 Å de longitud y 50 a 60 Å de anchura), con un peso molecular de 5×10^5 a $1,5 \times 10^6$ daltons, calculado a partir de estas dimensiones.

Estudios de microscopia electrónica en relación con la endotoxina de Bordetella pertussis muestran una mezcla de varillas largas y cortas, con un diametro uniforme de 50 a 60 Å de ancho. Al tratar con deoxicolato sodico y dializar, las

partículas obtenidas son de unos 300 a 400 Å de largo y 50 a 60 Å de ancho (5×10^5 a 10^6 daltons de peso molecular).

La endotoxina extraída de S. enteriditis tiene forma de varillas cortas de 50 a 60 Å de diametro. El tratamiento con deoxicolato seguido de dialisis, no varía el tamaño de las partículas y se ve que las partículas mas pequeñas tienen una longitud de 120 Å (2 a 3×10^5 daltons), aunque las mas numerosas son aquellas que tienen 200 - 250 Å (300.000 - 600.000 daltons). Una parte de estas varillas o bastoncillos son mas largas; equivalentes a un peso molecular de unos 10^6 daltons. Si esta preparación se extrae con fenol-agua, se obtiene el lipopolisacárido en forma de agregados muy largos. Se postula que los largos filamentos, constituidos por varias subunidades de endotoxina, se pueden disgregar mediante la acción del deoxicolato y después ligarse a proteínas del plasma, de tal modo que se mantienen en una forma disgregada y que carece de toxicidad.

En cuanto a otros tratamientos despolimerizantes, LOPES e INNIS (1969), utilizando el microscopio electrónico, observaron el proceso de disgregación de las estructuras acin-tadas del lipopolisacarido de una cepa de E. coli, mediante tratamientos con polimixina, en tanto que SHANDS y GRAHAM (1969), al disolver el lipopolisacarido de S. typhimurium en 0,5% de Tween 80, también consiguen disgregar en cortos segmentos las largas cintas formadas por este tipo de sustancias; comprobando, además, que el lipopolisacarido se encuentra frecuentemente incluido dentro de gotas de Tween 80 y también, que en algunas partes, estas láminas se separan y dejan ver entre ellas -ocasionalmente- una fina linea de colorante.

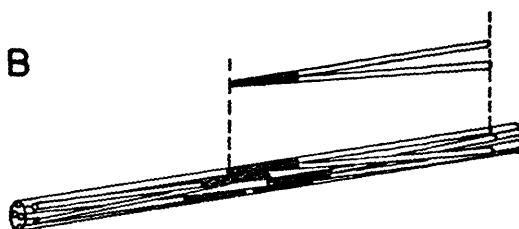
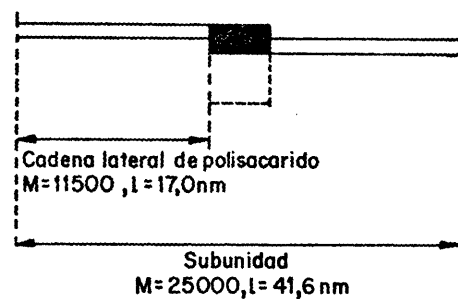
Ello parece sugerir que el Tween 80 ha penetrado en la región hidrofóbica de la molécula y ha separado las dos mitades. Por otra parte, también la agitación en agua saturada con eter dietílico (disolvente no polar) dá lugar a la dispersión de las cintas de lipopolisacárido, y desorganiza algunas de las bicapas transformándolas en monocapas. Esta acción llega a disgregar las cintas de lipopolisacárido en pequeños discos; algunos de los cuales se tiñen con la mitad de la densidad que la mayoría. Este fenómeno también se ha observado cuando el lipopolisacárido se disuelve en piridina acuosa o deoxicolato (SHANDS y GRAHAM, 1969).

Todo esto obliga, por lo tanto, a pensar en que las interacciones hidrofóbicas son las responsables, principalmente, de la unión de las dos mitades de lipopolisacárido polímero; y también, que estas fuerzas ocurren entre los lípidos no polares que constituyen la parte interna de la bicapa. Asimismo, es probable que estas interacciones hidrofóbicas contribuyan a la polimerización lineal del lipopolisacárido, ya que estos agregados se rompen por tratamientos que reducen la constante dieléctrica del medio que las rodea.

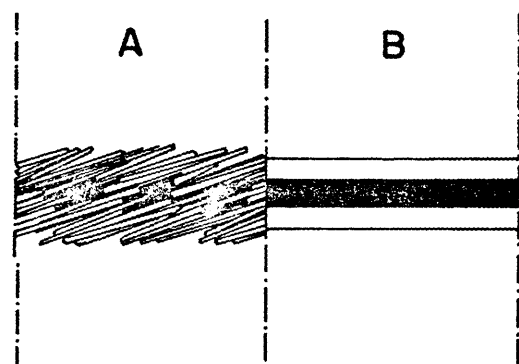
HANNECART-POKORNI y cols. (1970 a y 1970 b) estudian al microscopio electrónico el lipopolisacárido de Shigella flexneri, cepa F 6 S del serotipo 5 b (extraído por el método de Boivin y purificado en columna de G-200) y encuentran que aparece como largos filamentos de longitudes y grosor variables, con un peso molecular entre 10×10^6 daltons y 45×10^6 daltons. Llama la atención el hecho de que estas estructuras filamentosas no sean observadas hasta después de la purificación del lipopolisacarido y cabe pensar que, tal vez, se originen durante

este proceso de purificación, a partir de ciertas estructuras esféricas que se aprecian claramente en la morfología del lipopolisacarido crudo. Esta estructura macromolecular, la consideran formada por la repetición de unidades menores -con un peso molecular de aproximadamente 150.000 daltons- unidas mediante una interacción hidrofóbica que se origina en la parte lipídica de la molécula, entre cationes bivalentes y algunos grupos carboxílicos. Esta estructura "unidad", obtenida por degradación del lipopolisacárido, mediante dodecilsulfato o deoxicolato sódicos aparece al microscopio electrónico como filamentos largos y finos, de un grosor de 40 \AA , que están junto a partículas globulares de diferentes formas. Asimismo, en presencia de concentraciones mas altas de estos detergentes, esta "unidad" se puede disgregar en subunidades de unos 25.000 daltons, lo que sugiere que también estan unidas entre sí por interacciones hidrofóbicas. Tres años mas tarde, estos mismos autores (HANNECART POKORNI y cols. 1973) hacen un estudio físico-químico y de microscopía electrónica sobre el modo de agregarse las subunidades para formar la "estructura unidad" y sus resultados sugieren que los agregados son de tipo micelar, quedando los lípidos localizados en la parte central de estas estructuras (Fig. 6).

Posteriormente HARTLEY y cols. 1974, también tratan el lipopolisacárido de Yersinia pestis con dodecilsulfato sódico y comprueban que se reduce su tamaño a fragmentos muy pequeños, no apreciables al microscopio electrónico; una vez mas resulta así confirmada la naturaleza agregada de un lipopolisacárido procedente de bacterias Gram-negativas. MAYBERRY-CARSON y cols. (1975), al tratar el lipopolisacárido de Thermoplasma acidophilum con 0,5 % de dodecilsulfato sódico, observan



Distribucion de la subunidad 1S en la 10S



Interpretación de la estructura en bicapa del filamento de lipopolisacarido. A) Colocación de las subunidades en el LPS bilamellar.- B) Representación esquemática de una sección de LPS observada al microscopio electrónico.

Fig. 6.- Estructura propuesta, por HANNEKART-POKORNI y cols, para el LPS de Shigella flexneri.

que se convierte en filamentos muy pequeños, y en formas esféricas o vesiculares, de tamaño de 30 a 100 \AA ; estas últimas aparecen con mayor abundancia.

HIRT y VESTAL (1975), han hecho un estudio comparativo de los distintos lipopolisacáridos obtenidos de Thiobacillus ferrooxidans cultivados en distintos medios. El lipopolisacárido obtenido de células cultivadas en medios con hierro, como fuente de energía, muestra en solución acuosa una morfología acintada, mientras que el procedente de células cultivadas en presencia de azufre adquiere una forma vesicular o globular y por último, el obtenido a partir de células cultivadas en condiciones heterotrofas presenta simultaneamente ambas morfologías.

También en 1975, GARCIA y cols. han caracterizado el lipopolisacárido extraído de Fusobacterium necrophorum y han comprobado que éste, al microscopio electrónico, presenta una estructura trilaminar en forma de cinta.

2. Ultracentrifugación analítica

Utilizando datos fisicoquímicos de sedimentación en ultracentrifuga, coeficientes de difusión, viscosidad intrínseca y volúmenes específicos parciales, también han sido estimadas la forma y dimensiones de las partículas de lipopolisacárido de varias especies bacterianas. RIBI y cols. (1966) han estudiado el lipopolisacárido extraído por el método del fenol-agua de cepas de E. coli, así como el extraído por el método del eter-agua de S. enteritidis. Las preparaciones de fenol-agua se hacen mas homogéneas por la adición de deoxicolato

seguido de dialisis. Cada preparación esta formada por agregados moleculares lineales y de dimensiones muy similares ($28 - 39 \text{ \AA}$ por $1160 - 1225 \text{ \AA}$) y con un peso molecular de 5×10^5 a 1×10^6 daltons ($s_{20,w}^0$ de 13 a 8 S). Las subunidades obtenidas por tratamiento con deoxicolato sodico poseen unas dimensiones, de unos $9,6 \times 10,4 \text{ \AA}$ por $220 - 259 \text{ \AA}$, un peso molecular de $8,8 \times 10^3 - 10,7 \times 10^3$ daltons y un coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}^0$) de 0,94 - 1,04 S. Los coeficientes de difusión los calculan según el metodo de SCHACHMAN (1957) y para conocer las dimensiones de las moléculas, a partir de los datos físicos, recurren a la relación entre la razón axial y la de fricción mediante la fórmula de Perrin (SVEDBERG y PEDERSEN, 1940).

Por otra parte, OLINS y WARNERS (1967) estudiaron el lipopolisacárido extraído por el método del fenol-agua de Azotobacter vinelandii; éste está formado por dos componentes polidispersos con diferentes constantes de sedimentación ($s_{20,w} = 8 - 16 \text{ S}$ y $s_{20,w} = 70 - 100 \text{ S}$). Tratando este material con EDTA (etilendiaminotetraacetato) se obtienen pequeñas subunidades homogeneas con un peso molecular de unos 134.000 daltons ($s_{20,w}^0$ de 5,66 S); en tanto que la dialisis en presencia de CaCl_2 de estas subunidades dá lugar a un polímero reasociado en el que su peso molecular se eleva a 973.000 d. ($s_{20,w}^0$ de 16,7S). También, según hemos visto anteriormente, el dodecilsulfato sódico condiciona bastante la disociación del polímero, pero la subunidad mas pequeña se obtiene por la acción combinada de dodecilsulfato sódico y el quelante de cationes divalentes EDTA; así se consiguen pesos moleculares de unos 65.000 d. ($s_{20,w}^0 = 3,59 \text{ S}$, una vez corregida por la unión de docecilfulfato). Según estos autores, esta unión del detergente a la molécula habla-

ría en favor de la existencia de grupos cationicos adyacentes a la región hidrofóbica, interpretación muy discutible, que resulta en claro contraste con su comportamiento como una molécula puramente aniónica, en experimentos de electroforesis y titulaciones potenciométricas, siendo los aniones fosfato y carboxilato los grupos responsables de la unión de iones Ca^{++} posiblemente. Estos autores (OLINS y WARNERS, 1967) sugieren que una combinación de interacciones iónicas, mediadas por iones calcio, e hidrofóbicas, son las responsables de la unión entre las distintas subunidades. Las medidas de velocidad y equilibrio de sedimentación (WARNER, 1958, LABAR y BALDWIN, 1962; LUDLUM y WARNER, 1965) y las medidas de viscosidad caracterizan las especies moleculares asociadas y disociadas, como partículas bastante homogéneas y asimétricas.

McINTIRE y cols. (1967) caracterizaron físicamente el lipopolisacárido extraído de E. coli K-235, manteniendo la reversibilidad de la acción disociante del dodecil-sulfato sódico, tanto por microscopía electrónica como por estudios de sedimentación en ultracentrifuga analítica. El lipopolisacárido en presencia de este detergente muestra un pico único, con un coeficiente de sedimentación $s_{20,w}^0$ de 4,7 S, calculado según SCHACHMAN (1957). El peso molecular de la subunidad lo determinan con un espectrofotómetro de dispersión de luz, siendo este de 410.000 d. y una disgregación a subunidades de un tamaño similar a este, la obtienen también por medio de hidroxilaminólisis y por introducción de, aproximadamente, 200 grupos succinilo por cada molécula. Con el primer procedimiento, la subunidad obtenida posee un $s_{20,w}^0$ de 7,3 S, un peso molecular de 330.000 d ó 431.000 d, según se utilice la dispersión de luz o la ecuación de Svedberg para calcularlo. En el segundo caso

el $s_{20,w}$ es de 9,1 S y el peso molecular de 485.000 d. (por dispersión de luz). Todos estos resultados sugieren que las preparaciones son bastante homogéneas, pero que tienen un alto grado de asimetría molecular, lo que se deduce de los valores de $s_{20,w}$ relativamente bajos en comparación con los pesos moleculares obtenidos por técnicas de dispersión de luz.

Por otra parte WEISER y ROTHFIELD (1968) estudiaron los lipopolisacáridos de Salmonella typhimurium, estirpe salvaje, y de S. typhimurium G-30 (deficiente en galactosa). Así comprobaron que el primero posee moléculas con un $s_{20,w}^0$ de 98 S, mientras que en el segundo estos valores son de 63 S. Análisis en equilibrio de sedimentación efectuado por el método de YPHANTIS (1964) indican la existencia de un peso molecular medio aparente de 6×10^6 . La línea obtenida al representar gráficamente los valores de concentración ($\ln C$) frente a los de distancia radial (r^2) aparece ligeramente curvada, lo que sugiere alguna heterogeneidad. Aunque la mayoría de las partículas son de 6×10^6 d, existen algunos contaminantes de 3×10^6 a 6×10^6 d. Cuando se disuelve el lipopolisacárido de la estirpe G-30 en un detergente neutro, isoocetil-fenoxipolyoxietilen-etanol (Triton X-100) al 0,1%, se observa una reducción hasta un $s_{20,w}^0$ de 3,5 S en comparación con 1,5 S que tienen las micelas de Triton X-100 al 0,1% únicamente. Esta constante de sedimentación resulta menos dependiente de la concentración en ausencia del detergente; alcanza una pendiente ligeramente positiva en la curva que se obtiene al representar gráficamente las variaciones de concentración frente a $1/S$. Además, experimentos de sedimentación a equilibrio, con este detergente, mostraron una dependencia lineal de $\ln C$ frente a r^2 indicando que probablemente se trata de un sistema monodisperso. El peso mole-

cular obtenido para el complejo lipopolisacárido-detergente fue 42.000 d. mientras que el del lipopolisacárido solo era de 19.000 d. Otros detergentes catiónicos o aniónicos, no tuvieron efecto disgregante en el lipopolisacárido de magnitud 63S. Finalmente, estos autores (WEISER y ROTHFIELD, 1968), sugieren que son de gran importancia las interacciones no polares entre el lipido A y las moléculas adyacentes de lipopolisacárido, y que es probable que la partícula 63 S represente una estructura micelar ordenada o cristalina líquida. Esto está de acuerdo con estudios de microscopía electrónica anteriores, en los que se indica que los lipopolisacáridos, en disolventes acuosos, originan estructuras laminares de tipo variable (ROTHFIELD y HORNE, 1967; SHANDS y cols., 1967).

También en 1967, RUDBACH y MILNER obtienen un coeficiente de sedimentación a 20° C (no corregido por concentración ni viscosidad) para el lipopolisacárido de E. coli 0111: B4 (Difco), que es mayor de 7S mientras que con dodecil-sulfato se produce un coeficiente de sedimentación de 1-2 S (las micelas de dodecil sulfato sódico tienen un coeficiente de sedimentación de 1 S). LEIVE y cols. 1968, analizando fisico-químicamente este mismo lipopolisacárido, extraído con EDTA, detectan en ultracentrifuga analítica dos picos, uno (F_1) muy amplio y heterogéneo, con partículas de coeficientes de sedimentación entre 10 a 80 S (la mayor parte de 20 a 22S) y un segundo pico (F_2) con un coeficiente de sedimentación a concentración cero de 5 a 5,5 S. La heterogeneidad del pico F_1 la eliminan mediante extracciones con cloroformo-metanol y de esta manera, el examen por ultracentrifuga, muestra que el F_1 es un pico simétrico con un coeficiente de sedimentación de 11S mientras que el F_2 sigue invariable. El análisis químico revela que ambas fracciones son lipopolisacáridos, difiriendo en que el F_2 tiene un contenido de carbohidratos mayor (glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y principalmente colitosa), mientras la composición del F_1

es similar a la obtenida por otros autores para esta misma estirpe bacteriana (EDSTROM y HEATH, 1967)

Asimismo, HANNECART-POKORNI y cols. (1970 b) obtienen para el lipopolisacárido de Shigella flexneri un coeficiente de sedimentación de 170 S, y un peso molecular de 45×10^6 d. El coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}^0$) de las unidades que forman este agregado (obtenidas por diversos procedimientos) es de 10,2 S y el peso molecular calculado por tres métodos distintos -el de Svedberg (SVEDBERG y PEDERSON, 1940), por gradiente de densidad en cloruro de cesio con óptica de Schlieren y mediante dispersión de luz (NEUGEBAUER, 1943)- son 310.000, 250.000, y 252.000 d. respectivamente. Las subunidades obtenidas a partir de estas unidades superiores poseen un coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}^0$) de 1,44 S y un peso molecular (calculado por el método de Svedberg) de 25.400 d. El polisacárido obtenido por hidroxilaminólisis tiene un coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}^0$) de 3,8 y 84.000 daltons de peso molecular (método de Archibald, ELIAS, 1969), mientras que el polisacárido obtenido por hidrólisis con ácido acético tiene 0.88 S de coeficiente de sedimentación y 9000 de peso molecular (método de Svedberg y Archibald).

También HANNECART POKORNI y cols. (1973) han determinado el $s_{20,w}^0$ y peso molecular del lipopolisacárido de Salmonella typhimurium (1,4 S y 18.000 d, respectivamente) y de Salmonella minnesota (1,48 S y 22.500 daltons); y más recientemente, HARTLEY y cols. (1974), han caracterizado el lipopolisacárido de Yersinia pestis y han encontrado que su coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}^0$) es de 76,2 S y su peso molecular -determinado por la ecuación de Maldelkern (MALDELKERN y cols. 1974)- es de 1.6×10^8 d.

Finalmente, en relación con enterobacterias, MORRISON y LEIVE (1975) determinan las constantes físicas del lipo-

polisacárido de E. coli 0111:B4 extraído por el método de butanol-agua y las comparan con las del extraído por el procedimiento de Westphal. Ambos lipopolisacáridos dan, en ultracentrifuga analítica, dos picos con distintos coeficientes de sedimentación ($s_{25,w}^0$), 8,3 S (LPS-I) y 16,8 S (LPS-II) para el obtenido con fenol, y 8,3 S (LPS-I) y 13,2 S (LPS-II) para el obtenido con butanol-agua. El peso molecular calculado por la relación $s_{25,w}^0 / D_{25,w}^0$ es $1,3 \times 10^6$ daltons y 9×10^5 daltons en el primer caso, y de $1,5 \times 10^6$ daltons y 7×10^5 daltons en el segundo. Los coeficientes de fricción (f/f_0) indican que el LPS I en ambos casos es una partícula en forma de varilla, mientras que el LPS II es menos asimétrica. El LPS-I parece tener las cadenas antigénicas laterales mas largas que el LPS-II, no consiguiendo disociarlo con 0.1% de dodecilsulfato sodico, ni con deacilación.

En relación con otras especies bacterianas de tipo no entérico hemos encontrado los trabajos de ROGERS y cols. (1969), quienes obtienen para el lipopolisacarido de Pseudomonas aeruginosa extraído por EDTA un coeficiente de sedimentación no corregido de 4,1 S. En esta misma especie RUBIO y cols. (1973), estudiando las propiedades físicas del complejo proteína-lipopolisacarido, señalan un coeficiente de sedimentación no corregido de 7,18 S y en presencia de deoxicolato a 1,37; pero sin embargo, no obtienen disgregación del lipopolisacarido con polimixina, ni con triton X-100.

Por otra parte, HIRT y VESTAL (1974) calculan los coeficientes de sedimentación ($s_{20,w}^0$) de tres tipos de lipopolisacárido extraídos de Thiobacillus ferrooxidans, según esta bacteria se cultive en medios con hierro, azufre o glucosa

y encuentran que estas moléculas tienen un coeficiente de sedimentación de 280 S, 61 S y 128 S respectivamente.

3. Cromatografía en gel

Varios lipopolisacaridos de distintas especies bacterianas, entre ellos el de Shigella sonnei y Shigella flexneri (ROMANOWSKA, 1970), Yersinia pestis (HARTLEY y cols. 1974), Serratia marcescens (TSANG y cols. 1974), Escherichia coli 0111:B4 (MORRISON y LEIVE, 1975) y las Salmonella typhi 0901, y Salmonella typhi R₂ (RAYNAUD y cols. 1973) debido a su alto peso molecular, se eluyen en columnas de Sepharosa 4B en el volumen de exclusión.

Esto, sin duda, dificulta -en general- la determinación de sus tamaños moleculares por cromatografía en gel aunque, el lipopolisacarido de Salmonella minnesota se eluya -sobre Sepharosa 4B- en la zona correspondiente a un peso molecular de 10^6 daltons y el lipopolisacárido de Escherichia coli K-235 (en condiciones de disociación con SDS al 0.5%) lo haga en columna de agarosa al 0,4% en la zona correspondiente a un peso molecular de 400.000 daltons.

Utilizando geles con un limite de exclusión mayor, Sepharosa 2B, HIRT y VESTAL (1975) llegan a fraccionar las formas globulares de lipopolisacarido de Thiobacillus ferrooxidans, que tienen un peso molecular del orden de $10 - 20 \times 10^6$ d. También los lipopolisacáridos de Thermoplasma acidophilum y de otros micoplasmas se eluyen en el volumen de exclusion de columnas de CPG-10-2000 (formadas por esférulas de vidrio o "glass beads"); ello parece indicar que se trata de pesos

moleculares superiores a 1.200.000 d. Al someterlos a tratamientos con dodecil-sulfato ó cetilmetiltrimetilamonio, las partículas formadas quedan retenidas en columnas de CPG-10-700 (límite de exclusión 300.000 d.), de acuerdo con su peso molecular, que resultó ser de unos 67.000 d. cuando se comparaba con unos patrones de peso molecular conocido (MAYBERRY-CARSON y cols. 1974, SUGIYAMA y cols. 1974).

4. Heterogeneidad

Quizas la mayor dificultad para el estudio de las propiedades fisicoquímicas del lipopolisacárido ha sido la acusada polidispersidad encontrada en la mayoría de la preparaciones endotóxicas. La variabilidad de tamaño del lipopolisacárido puede ser muy grande, como se ha podido comprobar por su comportamiento en ultracentrifuga analítica (OLINS y WARNER, 1967) o por sedimentación en gradiente de sacarosa (BEER y cols. 1966). Estimaciones de los pesos moleculares de estas moléculas de lipopolisacárido indican que estos pueden variar de 1 a 20×10^6 d. (SCHRAMM y cols. 1952, LUDERITZ y cols. 1966 b). La polidispersión de tamaños es particularmente característica en los extractos de fenol-agua de bacterias Gram-negativas, pero también se encuentran en esta situación los extractos resultantes obtenidos por otros procedimientos.

No sólo son heterogeneas en tamaño las preparaciones de lipopolisacaridos, sino también en su carga superficial; lo que complica aún más los aspectos relativos a su heterogeneidad.

El lipopolisacarido se ha considerado generalmente como un polianión (SCHRAMM y cols. 1952; OROSZLAN y MORA, 1963, OLINS y WARNER, 1967); sin embargo, cuando se hace inmuno-electroforesis, muchas de las preparaciones migran hacia el cátodo (McINTIRE y cols. 1967). Se han encontrado iones calcio y magnesio, en las preparaciones de lipopolisacáridos, (BURTON y CARTER, 1964). La carga neta superficial del lipopolisacárido depende por un lado, del número de grupos fosfatos presentes y por otro, del número de iones y aminoácidos que comporta su molécula. Aunque se ha descrito para el lipopolisacárido de Escherichia coli homogeneidad de carga (SCHRAMM y cols. 1952), muchas preparaciones son bastante heterogeneas, como se demuestra por los complejos perfiles de elución obtenidos con diferentes preparaciones de lipopolisacárido a través de columnas de cambio de ión (NOWOTNY, 1966).

McINTIRE y cols. (1969) encuentran heterogeneidad en las preparaciones de lipopolisacárido de E. coli K-235 al cromatografiarlas en presencia de deoxicolato sódico a través de Sephadex G-100, aunque anteriormente -con lipopolisacáridos de S. enteritidis y Aerobacter aerógenes- no pudieran demostrarla por cromatografía en presencia de dodecil-sulfato sódico (McINTIRE y cols. 1967).

RYAN y CONRAD (1974), estudiando el lipopolisacárido de Salmonella newington, también observan una heterogeneidad estructural, que resulta debida principalmente a la distinta longitud de las cadenas antigénicas laterales. Estas diferentes moléculas las fraccionan en cromatografía sobre DEAE-celulosa -eluyendo, primero con Triton al 1% y luego, con un gradiente de cloruro sódico en triton X-100- en total obtienen 7 frac-

ciones que difieren entre sí en la longitud de las cadenas de carbohidratos. Esta heterogeneidad, la explican los autores, al considerar que esta Salmonella newington, es capaz de sintetizar la cadena lateral de antigenicidad O y transferirla en diferentes grados de polimerización al polisacárido central. Concluyen que ninguna de sus fracciones ha alcanzado un grado de homogeneidad.

Recientemente, MORRISON y LEIVE (1975) han aislado, por cromatografía en Sepharosa 4B dos fracciones a partir del lipopolisacárido de E.coli 0111:B4; estas difieren en que una contiene cadenas mas largas que la otra. La fracción de peso molecular mayor no se disocia con detergentes, mientras que la otra si lo hace al emplear Triton X-100 ó dodecil-sulfato sódico.

La heterogeneidad de un lipopolisacárido, dentro de un organismo, puede ser debida -en ocasiones- a una asociación reversible (NOWOTNY y cols. 1966, BEER y cols. 1966, RUDBACH y cols. 1967) pero, en otras, el fenómeno se produce por la presencia de fracciones verdaderamente distintas, dentro de un mismo organismo, como ha sido sugerido por varios autores. Así, KOELTZOW y CONRAD (1971), utilizando columnas de DEAE-celulosa y 1% de Triton X-100, encontraron dos fracciones en el lipopolisacárido de Aerobacter aerogenes; una de ellas, de cadenas laterales muy largas con alto contenido en carbohidratos y otra, de cadenas muy cortas, en la que no se obtenían tamaños moleculares intermedios. Fracciones de lipopolisacárido con diferentes tamaños, se han obtenido también de varias cepas de S. typhimurium y S. anatum (HSU y CONRAD, 1971). Este fenómeno

parece ser común a varios microorganismos y sugieren la posibilidad de que estos lipopolisacáridos ocupen distintas posiciones en la membrana.

Varios autores -como BURTON y CARTER, (1964), ALAUPOVIC y cols. (1966) y TSANG y cols. (1974)- han observado heterogeneidad, en varios lipopolisacáridos extraídos por el metodo del fenol-agua a partir de distintas especies bacterianas y sugieren que esta degradación del lipopolisacárido puede ser una consecuencia del procedimiento de extracción empleado.

Con vistas a facilitar el estudio fisico-químico de estas moléculas, se han hecho grandes esfuerzos para remediar la polidispersidad de algunas de estas preparaciones de lipopolisacárido. Entre ellos destacan: a) adición de solventes orgánicos tales como piridina (LUDERITZ y cols. 1966 b); b) adición de detergentes o surfactantes seguida de diálisis (RIBI y cols. 1966, BEER y cols. 1965); c) diálisis frente a agentes quelantes (OLINS y WARNER, 1967); d) empleo de ultrasonido (SHANDS y cols. 1967); y e) electrodiálisis del lipopolisacárido y conversión en sales que, en soluciones acuosas, puedan mantener un peso molecular y propiedades físico-químicas constantes (GALANOS y LUDERTIZ, 1975).

5. Espectroscopia ultravioleta e infrarroja

Es difícil formarse un criterio invariable en el analisis espectroscópico UV de estas moléculas, sin embargo la ausencia de una banda de absorción a 260 nm de longitud de onda es considerada como criterio de pureza (RIBI y cols.

1966, TSANG y cols. 1974, HOLLINGDALE, 1975), aunque algunos autores (HANNECART-POKORNI y cols. 1970) observan la presencia de un pequeño hombro a 260 nm, que se hace mas intenso en los polisacáridos obtenidos después de una hidrolisis suave, y se acentua aún mas después de hidrolisis fuerte. El tratamiento con nucleasas no modifica el espectro ultravioleta y ello hace poco probable que esta banda esté originada por la presencia de ácidos nucleicos, aunque sí pudiera deberse, esta absorción, a compuestos nucleotídicos. Por cromatografía en capa fina se ha determinado que la citidina es el nucleotido mas abundante y varios autores sugieren que este nucleotido puede actuar de manera similar al de UDP-glactosa, TDP-ramnosa, GDP-manosa, y CDP-abecucosa, en el caso de Salmonella typhimurium como cofactor en la transferencia de monosacaridos al lipopolisacárido durante la biosíntesis de éste. (OSBORN, 1969; WEINER y cols. 1965; OSBORN y WEINER, 1968; OSBORN y YUANTZE-YUEN, 1968; CYNKIN y OSBORN, 1968, KENT y OSBORN, 1968).

En el caso del lipopolisacárido de Salmonella anatum, el nucleotido CDP no interviene en su formación (WRIGHT y cols. 1967; WRIGHT y cols. 1965, DANKERT y cols. 1966; BRAY y ROBBINS, 1967; KANEGASAKI y WRIGHT, 1970).

Por otra parte, también se han realizado estudios analíticos mediante espectroscopía infrarroja de distintos lipopolisacáridos bacterianos: Azotobacter vinelandii (OLINS y WARNER, 1967), Neisseria meningitidis (JENNINGS y cols. 1973), Serratia marcescens (TSANG y cols. 1974), Yersinia pestis (HARTLEY y cols. 1974), Thiobacillus ferrooxidans (HIRT y VESTAL, 1975), Microspolyspora faeni (HOLLINGDALE, 1975) y otros. La interpretación de estos espectros es bastante complicada, y la asignación de bandas a los distintos grupos funcionales resulta, en ocasiones, un poco aventurada.

IV. ESTRUCTURA QUIMICA DEL LIPOPOLISACARIDO

En términos generales, un lipopolisacárido es un heteropolímero compuesto de las tres regiones diferentes que se indican en la Fig. 7. De ellas, el antígeno O (Región I), esta formada por unidades repetitivas de oligosacaridos que contienen moléculas de azucares y agrupamientos químicos específicos, responsables del serotipo para cada microorganismo. Unida a esta porción antigénica se encuentra la región II - ó nucleo central basal, que es común para el caso de las Salmonella y algunas otras bacterias a nivel de género. Por último la región III constituye la parte lipídica de la molécula y comunmente se la conoce como lipido A. Esta parte forma el extremo hidrofóbico de la molécula, por el que se asocia con la membrana externa. El lípido A se puede obtener bastante completo por hidrólisis suave con ácido acético al 1% (FENSOM y MEADOW, 1970).

Se han analizado los azucares constituyentes de muchos lipopolisacaridos bacterianos mediante hidrólisis previa del

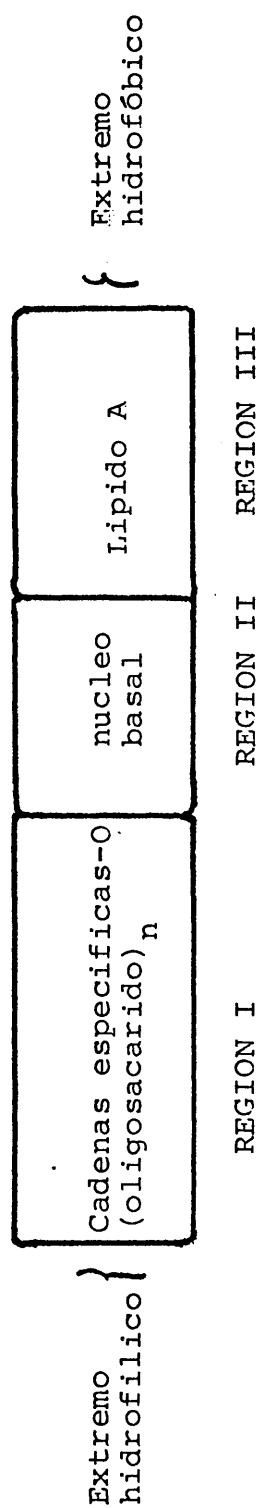


Fig. 7.- Esquema de la estructura general de lipopolisacaridos.

polisacárido seguida de un fraccionamiento por cromatografía en papel (o capa fina) por electroforesis sobre papel o por cromatografía gas-líquido. En este último caso se hace preciso realizar previamente una reducción con borohidruro sódico y subsiguiente conversión de los productos en per-o-trimetilsilil derivados (OHASHI y YAMAKAWA, 1973). Así se han identificado por lo menos 30 azúcares distintos en el antígeno O de diferentes bacterias Gram negativas. (Cuadro I). Además de lo enumerado en esta tabla, hay un componente bastante frecuente: el ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico (KDO) descubierto por primera vez en el lipopolisacárido de E. coli 0111 por HEATH y GHALAMBOR (1963). Esta molécula puede identificarse, generalmente, por la reacción del ácido tiobarbitúrico y también, a veces, por su movilidad en cromatografía o electroforesis sobre papel (ELLWOOD, 1966, 1968). Sin embargo, esta reacción no es específica del KDO, ya que todos los ácidos 2-ceto-3-deoxialdónicos pueden dar esta reacción (GIELEN, 1968, CLAUS, 1965). La unión cetosídica del KDO es ácido lábil, mientras que la unión glicosídica de éste a otro azúcar (por ejemplo heptosa) es bastante estable a la hidrólisis ácida.

La fosforiletanolamina es también un constituyente de lipopolisacáridos procedentes de estirpes de Salmonella y E. coli (IKAWA y cols. 1953, GROLLMAN y OSBORN, 1964).

De acuerdo con la composición de los azúcares que existen en los lipopolisacáridos, se han clasificado diversas bacterias Gram-negativas en distintos quimotipos. Casi todos los lipopolisacáridos contienen 5 ó más azúcares constituyentes, siendo los más frecuentes glucosamina, heptosa, KDO, galactosa y glucosa; estos, por lo general, integran la parte central

CUADRO I.- Diferentes moléculas de carbohidratos, encontradas como componentes de lipopolisacáridos microbianos, con indicación de su origen y referencia bibliográfica.

ESTRUCTURA	CONFIGURACION	NOMBRE VULGAR	PRESENCIA EN MICROORGANISMOS
Hexosas	Glucosa D Galactosa D Manosa D		Frecuente Frecuente Frecuente
6-O-Acetil-hexosa	Galacto-D Gluco-D		Frecuente Frecuente
6-O-metil-hexosa	Gluco-D		<i>Mycobacterium phlei</i> (525)
3-O-metil-hexosa	Gluco-D Mano-D		<i>Mycobacterium phlei</i> (525) <i>E. coli</i> O8, <i>Klebsiella</i> O5 (400) <i>Rhodopseudomonas viridis</i> (582)
6-Deoxihexosas	Galacto L Mano L Mano D Talo L	Fucosa Ramnosa Ramnosa	Frecuente Frecuente <i>Xanthomonas campestris</i> (251) <i>E. coli</i> O45 (415), <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (582)
3-O-metil-6-deoxi-hexosas	Talo D Mano L	Acovenosa Acofriosa	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (582) <i>Anabaena variabilis</i> (583), <i>Klebsiella</i> K 73: O10 (50)
3,6-Dideoxihexosas	Gluco D Galacto D Galacto L Mano D Mano L	Paratosa Abecuesa Colitosa Tivelosa Ascarilosa	<i>P. pseudotuberculosis</i> 1:III (111) <i>Salmonella</i> grupo A (294) <i>P. pseudotuberculosis</i> II (111), <i>Salmonella</i> grupos B, C (294) <i>E. coli</i> O111:B4 (141) <i>Salmonella</i> grupos D (111), <i>P. pseudotuberculosis</i> (111) <i>P. pseudotuberculosis</i> V (111)
Pentosas	Ribosa D Ribosa Xilosa Arabinosa		<i>Azotobacter vinelandii</i> (410), <i>Coxiella burnetii</i> (26) <i>Coxiella burnetii</i> (26), <i>Myxococcus fulvus</i> , (477), <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (582), <i>Cystobacter</i> (477), <i>Flexibacter</i> (477) <i>Microspolyspora faeni</i> (1975) (262) <i>Myxococcus fulvus</i> (477)
4-O-metil pentosa 3-O-metil-pentosa 3-O-metil-pentosa	Xilosa D Xilosa L Xilosa D		<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (582) <i>Rhodopseudomonas viridis</i> (582) <i>Myxococcus fulvus</i> (477)
Heptosas L-glicero D-glicero	Mano-D Mano-D		Frecuente <i>Serratia marcescens</i> (7), <i>Br. melitensis</i> (308), <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> (7), <i>Proteus mirabilis</i> (208) <i>C. violaceum</i> (7)
D-glicero	Galactosa D		
2-amino-2-deoxihexosas	Gluco D Galacto D Mano D	Glucosamina Galactosamina Manosamina	Frecuente Frecuente <i>Salmonella</i> (333), <i>E. coli</i> K235 (333), <i>Arizona</i> 15 (333)
6-O-metil-2-amino-2-deoxihexosa	Gluco D		<i>R. palustris</i> (582)
2-amino-2-deoxi-D-gliceroheptosa	Ido o Gulo-D		<i>Anacystis nidulans</i> (590.)
2-amino-2,6-dideoxi-hexosa	Gluco Gluco D Galacto-D,L Galacto Mano L	Quinovosamina Quinovosamina Fucosamina Fucosamina Ramnosamina	<i>B. abortus</i> , <i>Br. melitensis</i> (60), <i>Rhodopseudomonas</i> (582), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (601) <i>Arizona</i> (333), <i>Proteus vulgaris</i> (333), <i>Salmonella</i> (333) <i>Achromobacter georgiopolitanum</i> (524) <i>Ps. aeruginosa</i> (543) <i>E. coli</i> O45 y otras (415) <i>E. coli</i> O3 (277)
3-amino-3,6-dideoxi-hexosas	Gluco Galacto		<i>C. freundii</i> (448), <i>E. coli</i> O5 (415) <i>X. campestris</i> (251), <i>E. coli</i> O2 (415) <i>Br. melitensis</i> (308)
4-amino-4,6-dideoxi-hexosas	Gluco Galacto	Viosamina Tomosamina	<i>E. coli</i> O7 (277) <i>E. coli</i> O10 (277)
Acido uronico	Galactouronico		<i>Citrobacter freundii</i> (448), <i>Rhodopseudomonas viridis</i> (582), <i>Ps. aeruginosa</i> (604).

del lipopolisacárido (región II).

En ocasiones se observan lipopolisacáridos bacterianos que presentan una composición defectiva, careciendo de algunos de estos azúcares. Así, el lipopolisacárido del género Xanthomonas carece de heptosa y galactosa, según han comprobado VOLK (1966 ; 1968 a, b,) por una parte y HICKMANN y ASHWELL (1966) por otra. También en el lipopolisacárido de un alga verde-azulada Gram-negativa se ha observado que no contiene heptosa, pero si heptosamina (WEISE y cols. 1970).

Los ácidos grasos, constituyentes del lípido A y obtenidos a partir de este por, hidrólisis ácida o básica, se analizan mediante cromatografía gas-liquido, para ello se convierten en ésteres metílicos por tratamiento con BF_3 -metanol (MORRISON y SMITH, 1964) o mediante metanolisis alcalina (WILKINSON, 1968). En el cuadro II se presenta un resumen detallado de la composición en ácidos grasos del lípido A de varias bacterias.

1. Estructura del antígeno O

Los primeros resultados sobre la estructura de estas cadenas específicas fueron obtenidos por análisis -mediante metilación, oxidación con peryodico, degradación ácida o alcalina- de los oligosacáridos obtenidos después de la hidrólisis parcial del lipopolisacárido, o del polisacárido degradado de las estirpes lisas.

CUADRO II Composición de los ácidos grasos integrantes del lípido A en distintos lipopolisacáridos microbianos.

Características de los ácidos grasos	Origen del lipopolisacárido y referencia bibliográfica
C 12:0, C14:0, C16:0, 3-OH-C14:0	Salmonella (331)
C12:0, C14:0, C15:1, 3-OH-C14:0 C16:0, 16:1, Δ 17:0, 18:1	E. coli (255 304)
3-OH-C14:0	Proteus mirabilis (390) Bordetella pertussis (292)
C12:0, C12:1, C14:0, 3-OH-C14:0, C15:1, C16:0 C17: ciclopropano, C18:0, C18:1	Aerobacter aerogenes (305)
C12:0, C14:0, C16:0	Serratia marcescens (575)
3 OH-C14, 3OH-C12	Neisseria perflava (6)
C12:0, C12:1, C16:0, 2 OH-C12:0 3OH-C10:0, 3OHC12:0	Pseudomonas aeruginosa (602)
3OH-C10	Pseudomonas alcaligenes (301)
C12:1, iso C13:0, C13:0, BrC13:1, C13:1, C14:1, br-C15:1, 3OH-C11:0, 3-OH-C12:0, br-3OH-C13:0, 3 OH-C13:0, 3OH-C14:0, br-3OH-C15:0	Pseudomonas rubescens (603)
(2-OH-C12:0), 3-OH-C12:0, 3-OH-C10:0	Azotobacter agilis (289)
C:12:0, 3OH-C10:0, 3-OH-C14:0	Rhodopseudomonas capsulata (584)
C14:0, 3OH-C14:0, C16:0, 3OH-C16:0	Rhodopseudomonas viridis (581)
C13:0, 3-OHC13:0, 3-OH-C15:0	Veillonella (47)
C12:0, C14:0, 14-Me-C14:0, 3-OH-13Me-C14:0 C16:0, 15 Me-C16:0, 3-OH-C14:0, 3OH-C16:0, 3-OH-15-Me-C16:0, 3OH-C16:0	Myxococcus fulvus (477)
9Me-C10:0, 3-OH-9-Me-C10:0, 3-OH-C12:0, 3-OH-11-Me-C12:0, C10:0, 3-OH-C10:0, 2-OH-9-Me C10:0	Xanthomonas sinensis (464)
3-OH-11-Me-C12:0, 3-OH-9Me-C10:0, C10:0, 9-Me-C10:0, 2OH-9-Me-C-10:0 3-OH-C10:0, 3-OH-C12:0	Xanthomonas campestris (464)
C16:0, C17:0, C18:0	Brucella melitensis (308) Brucella abortus (44)
C14:0, C16:0, C18:0, C19:0, C22:0, 3OH-C14:0	Coxiella burnetii (36)
C12:0, C15:0, C16:0, 3-OH C12:0 3-OH-C14:0	Neisseria meningitidis (279)
3-OH-C14:0, 3-OH-C16:0 C16:0, C18:1, C16:1	Rhizobium trifolii (494)
C14:0, C16:0, C18:1	Rhizobium japonicum (75)
C12:0, 2-OH-C12:0, C14:0 C14:1(3-OH-C14:0), C15:0, (C15:1), C16:0, C17:0, C18:0, C18:1, 2OH-C18:0 C19:0, (C19:0-cíclico)	Thiobacillus ferrooxidans (255)
C14:0 (ramificado), C15:0, C16:0, C18:0 C12:1, C13:1, C14:1, C15:1, C16:1 C17:1, C18:1, C20:1, 3-OH-C10:0, 3-OH-C11:0, 3-OH-C12:0, 3OH-C13:0, 3-OH-C14:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0	Vibrio cholerae (19)
C12:0, C14:0, 13-Me-C14:0, C16:0, 14-Me-C15:0, C17:0, 15-Me-C16:0	Cystobacter ferrugineus (477)
3-OH-C14:0, 3-OH-13Me-C14:0 3-OH-C16:0, 3-OH-15Me-C16:0	
C12:0, 13-Me C14:0, C16:0 C17:0, 15MeC16:0, 3-OH-C14:0 3-OH-13-Me-C14:0, 3-OH-C16:0 3-OH-15Me-C16:0	Flexibacter (477)
C12:0, C16:0, C18:0, C22:0, 3-OH-C14:0	Anacystis nidulans (590)
3-OH-C14:0, 3-OH-C16:0 2-OH-C18:0, C16:0	Anabaena variabilis (583)



En 1970, BJORN DAL y cols., por medio de una combinación de cromatografía de gases y espectrometría de masas, obtuvieron datos estructurales del lipopolisacárido extraído de paredes celulares bacterianas.

El método consiste en la identificación de azúcares, parcialmente metilados, que han sido obtenidos por hidrólisis de polisacaridos totalmente metilados. Los azúcares metilados se convierten en los correspondientes O-acetil-O-metil-alditoles, que pueden ser identificados y cuantificados por un análisis en cromatografía gas-líquido, combinado con un espectrómetro de masas.

Las unidades químicas, se obtienen de los hidrolizados ácidos, mientras que las unidades biológicas sólo se pueden deducir de estudios biosintéticos y, mas recientemente, de estudios de metilación, según se esquematiza en la Fig. 8.

Los grupos serológicos de Salmonella D₁, D₂, B, A y E, poseen todos ellos una unidad biológica similar; los azúcares constituyentes y su secuencia son los mismos. Difieren unicamente en la posición anomérica de dichos azúcares, unión entre la galactosa y la manosa, pequeñas cadenas laterales sobre la galactosa y la manosa y la presencia de O-acetilos en los diferentes azúcares.

La estructura del antígeno O mas generalmente admitida es:

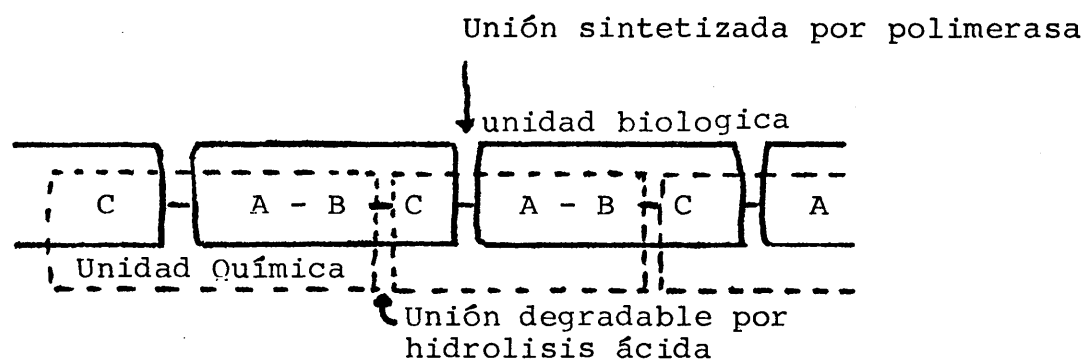
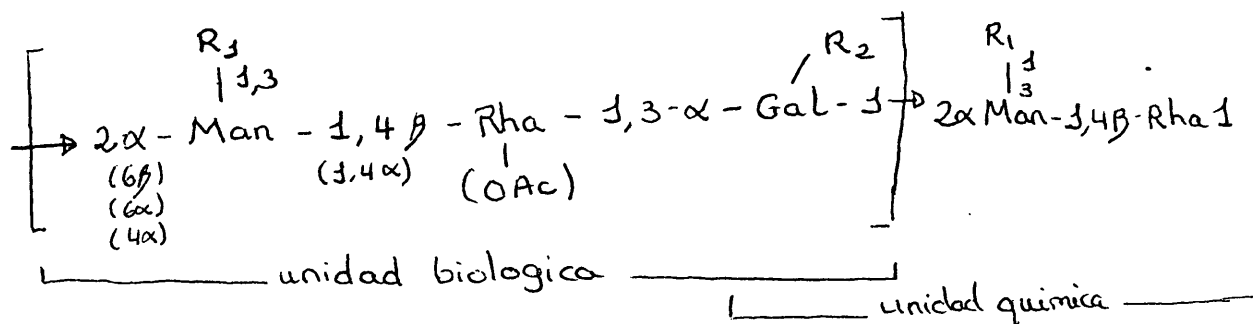


Fig. 8.- Representación esquemática de las unidades químicas y biológicas de las cadenas O específicas.



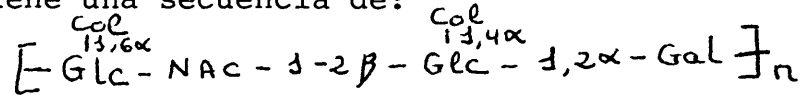
Siendo R_1 -en el caso de que exista esta cadena lateral- α tivelosa, α abecucosa, $Ac-O-2\alpha$ -Abecucosa ó α -Paratosa y el R_2 , α Glc ó $Ac-O-2\alpha$ -Gluc.

Los subgrupos de Salmonella E_2 y E_3 son los mismos del subgrupo E_1 convertidas por fagos. Así el fago Σ^{15} cambia la α -galactosa del subgrupo E_1 en β -galactosa del subgrupo E_2 y suprime la acetilación de ésta. La conversión por el fago Σ^{34} del grupo E_2 , produce la cadena lateral α -Glc-1,4 Gal del subgrupo E_3 . La misma estructura de disacarido también está presente en los grupos B y D. Todos estos grupos estan quimicamente y, también con muchas probabilidad, genéticamente relacionados.

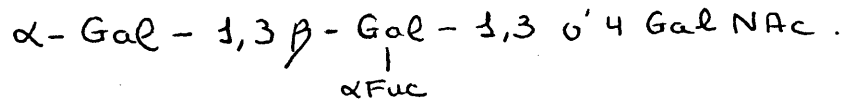
En cuanto a los grupos serológicos de Salmonella C, G, N, U y L son bastante diferentes entre sí en la estructura de sus lipopolisacaridos y además no se han hecho estudios biosinteticos todavia, limitandose los ensayos al análisis de los oligosacaridos aislados y a estudios de metilación con el lipopolisacárido.

También se han estudiado los antígenos O de otras enterobacteriaceas y así se ha visto que el de E. coli O111:

B₄ tiene una secuencia de:

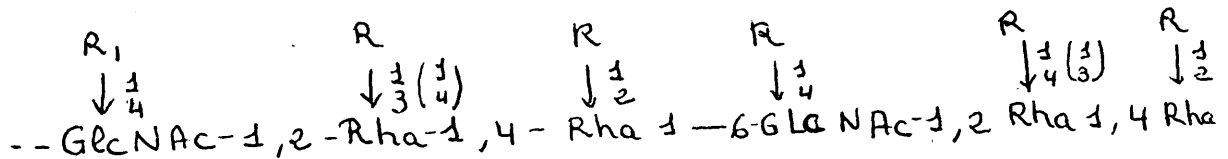


elucidada por los trabajos de EDSTROM y HEATH (1965, 1967, 1971). Asimismo, utilizando datos químicos e inmunológicos, SPRINGER y cols. (1966), han propuesto para el lipopolisacárido de E. coli 086:B7 una estructura correspondiente a:



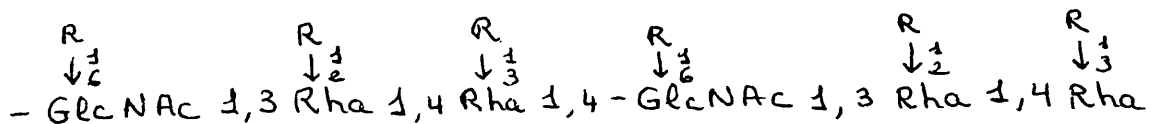
A diferencia del lipopolisacarido de E. coli K-12, que contiene en sus cadenas laterales un esqueleto de (Glc₂-Gal₂-Rha), según se deduce del trabajo de BOMAN y MONNER (1975).

En el caso de Shigella flexneri (SIMMONS, 1971), la secuencia es similar en los distintos serotipos, variando las pequeñas cadenas laterales y la unión entre oligosacaridos, principalmente, según se indica a continuación:

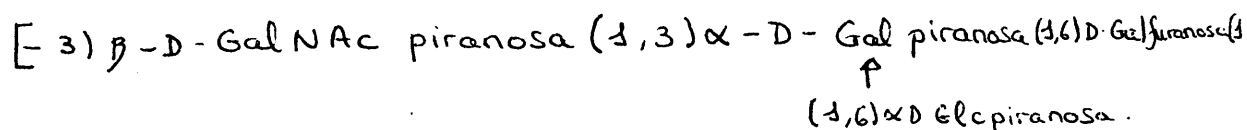


El radical (R) es la α Glc, que puede estar sustituyendo en alguna de las posiciones que se indican, según los serotipos.

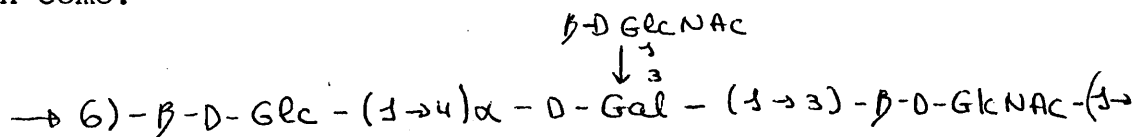
En ciertos serotipos el esqueleto es:



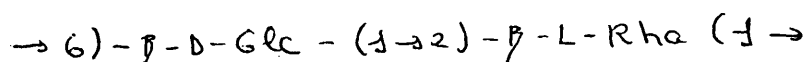
El sustituyente, en este caso, es también α Glc en una o varias de estas posiciones; aunque también puede ser α -Ac-Glc. Para el caso de Shigella dysenteriae tipo 3, (DMITRIEV y cols, 1975) han dado la siguiente estructura



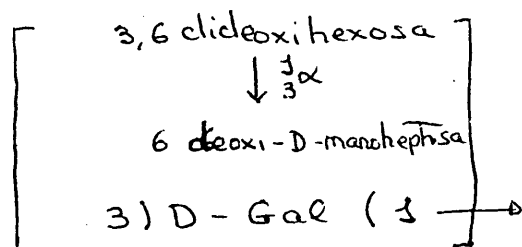
En cuanto a otros géneros bacterianos TARCSAY y cols. (1973) han dilucidado la estructura del antígeno O del lipopolisacárido de la Serratia marcescens 08 y la representan como:



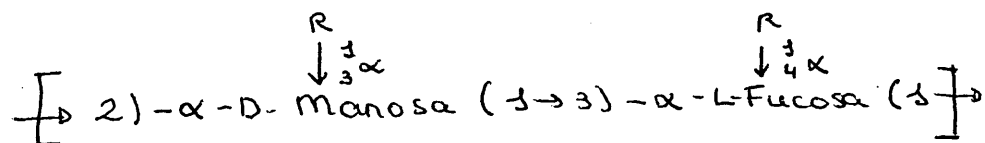
mientras que la de Serratia marcescens, cepa Bizio, determinada en el mismo laboratorio por WANG y ALAUPOVIC (1973), parece ser:



SAMUELSSON y cols. 1974 obtienen para el lipopolisacárido de Yersinia pseudotuberculosis secuencia repetitiva consistente en:



Esta secuencia puede variar su estructura en otros serogrupos de acuerdo con el esquema:



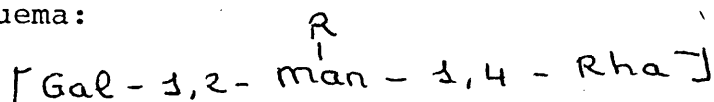
en el que R es la 3,6 dideoxihexosa, que puede estar sustituyendo alguna de las posiciones indicadas según el serotipo de que se trate.

Los factores antigénicos O corresponden a oligosacáridos que contienen de 2 a cuatro (o más) azúcares, uno de los cuales es el azúcar inmunodominante. Este azúcar inmunodominante, que no es reductor, con frecuencia está en la posición terminal de la cadena principal o de una cadena lateral; aunque también, en algunos casos, puede ser un constituyente interno de la cadena principal. Se han obtenido datos sobre los distintos factores comparando varios azúcares y oligosacáridos como inhibidores de la precipitación o de la fijación de complemento por el sistema factor-antifactor. De esta manera se puede saber qué azúcar es el inmunodominante; es decir, cual es el que presenta una afinidad mayor por la molécula de anticuerpo (LUDERITZ y cols. 1966 b). Aunque este azúcar tiene un papel muy importante en la especificidad del factor, por si mismo no es capaz de exhibir una especificidad completa. Se pueden encontrar diferentes factores con un mismo azúcar inmunodominante, en cuyo caso pueden ocurrir 3 cosas: a) que los factores correspondan a diferentes grupos determinantes producidos al visualizar el mismo oligosacárido desde diferentes

ángulos, b) que los factores correspondan a diferentes grupos determinantes situados en los dos extremos opuestos del azúcar inmunodominante, c) que los factores correspondan a oligosacáridos de diferentes tamaños y constituyan partes del mismo grupo determinante, dando lugar así a una familia determinada de factores. En la figura 9 vienen representadas estas tres posibilidades de un modo esquemático.

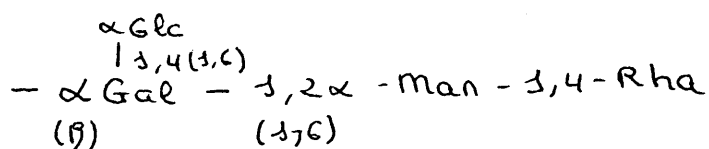
Los factores conocidos del gen. Salmonella se pueden subdividir en varios apartados:

a) Factores con α -3,6 dideoxihexosa como azúcar inmunodominante. Este puede ser, por ejemplo, la paratosa, α abecuesa, α tivelosa, etc (STAUB y BAGDIAN, 1966), según el esquema:



donde R puede ser la paratosa, α abecuesa, α tivelosa, etc. En estos casos, la unión galactosil-manosa, juega un papel bastante importante en la especificidad del factor.

b) Factores conteniendo glucosa como azúcar inmunodominante de acuerdo con el esquema:



Los diferentes determinantes antigénicos, o factores, difieren entre sí en las dos diferentes posiciones anoméricas de las galactosa; o bien, según la unión existente entre la

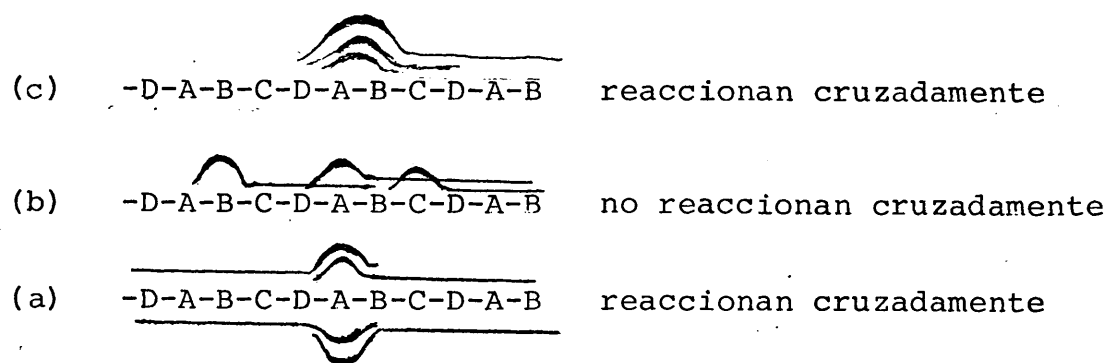


Fig. 9.- Representación esquemática de un factor antigenico y de algunas familias de este tipo de factores.
 (a) una familia de factores que corresponden al mismo grupo determinante (b) factores que corresponden a distintos azúcares inmunodominantes (c) familias de factores que corresponden al mismo azúcar inmunodominante presente en diferentes grupos determinantes.

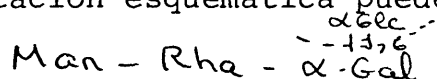
Glc y Gal, o entre Gal y Man. (UCHIDA y cols. 1963).

c) Factores presentes en la cadena principal. Se ha visto, por el grupo anteriormente citado, que el azucar inmunodominante puede estar presente en la cadena de oligosacaridos; este es el caso de la manosa (Factor 3). La reacción entre los polisacáridos pertenecientes a distintos grupos conteniendo este factor es mayor cuando la posición anómérica de la galactosa es la misma. Algunos anticuerpos estan adaptados a la parte no sustituida de la manosa, en el caso de que ésta se encuentre en esas condiciones.

d) Factores relacionados con grupos O-acetilos. La especificidad de estos factores depende de la presencia de grupos O-acetilos lábiles, tales como 2-O-acetil-galactosa, 2-O-acetilabecuesa (3,6-dideoxigalactosa), N-acetil-galactosamina.

Las mutaciones, y conversiones por fago inducen cambios de estructura química, que condicionan variaciones en uno o varios factores antigénicos del lipopolisacárido.

Las Salmonellas pertenecientes a los grupos A, B y D, generalmente poseen en su LPS cadenas laterales de α -gluc-1,4-Gal, pero se pueden conseguir mutantes en los cuales dichas cadenas no esten presentes o sean muy raras (KAUFFMANN, 1966); su representación esquematica puede ser del tipo:



Los mutantes SR (semirugosos), de estas especies, contienen unido al nucleo central pequeñas cantidades de azucares del antígeno O (MÄKELA y SARVAS, 1969). Asimismo se han comprobado conversiones y modificaciones del LPS de Salmonellas, originadas por la acción de distintos fagos (LE MINOR, 1963, 1968, STAUB y BAGDIAN, 1966, ROBBINS y UCHIDA, 1965, FULKER y STAUB, 1968). Los cambios observados después de estas conversiones estan relacionados con la unión entre las unidades biológicas repetitivas (uniones de polimerización) o con las cadenas laterales. Esto es razonable, ya que cualquier otro cambio estructural distinto puede modificar la unidad repetitiva de la cadena principal y hacerlo de tal forma que pueda llegar a inhibirse la reacción de polimerización.

2. Estructura del nucleo basal del lipopolisacárido

El estudio de esta estructura (como en el caso de Salmonellas, en todo el género), se ha realizado principalmente mediante el empleo de mutantes deficientes en la síntesis de lipopolisacárido.

Se pueden distinguir dos grupos principales de mutantes rugosos: los mutantes Ra que no realizan la síntesis del antígeno O y por lo tanto su lipopolisacárido carece de la región I, y los mutantes Rb, c, d, e, que no tienen antígeno O y además tienen un nucleo mas o menos incompleto que hace que se acumulen los precursores. El hapteno O puede estar libre o conectado al sistema portador-P-P-lípido.

Estos microorganismos se diferencian de las estirpes lisas parentales en muy diversos aspectos, como puede ser: morfología de las colonias, crecimiento en medio líquido, características genéticas, diferentes sensibilidad a antibióticos y agentes químicos, etc.

Por otra parte, los mutantes rugosos, se pueden clasificar en los quimotipos Ra, Rb, Rc, Rd y Re de acuerdo con la composición de azúcares de su lipopolisacárido y esto da lugar, paralelamente, a diferencias en sus serotipos. Generalmente los lipopolisacáridos pertenecientes a un mismo quimotipo presentan unas fuertes reacciones cruzadas entre sí, mientras que éstas casi no ocurren entre los de distinto quimotipo. También se han utilizado los fagos para clasificar estos mutantes, así como el tipo de defectos que pueden aparecer en su dotación genética, que da lugar a diversos genotipos. Es lógico suponer que por medio de todos estos métodos se puede llegar a una mas detallada caracterización de los distintos mutantes.

Los mutantes rugosos se pueden caracterizar por defectos específicos en el metabolismo de los precursores mediante bloqueos definidos en la biosíntesis del lipopolisacárido.

Los mutantes SR de S. typhimurium y S. anatum, según demostraron algunos autores carecen de la polimerasa de elongación de la cadena lateral (NAIDE y cols. 1965, LOSICK y ROBBINS, 1967).

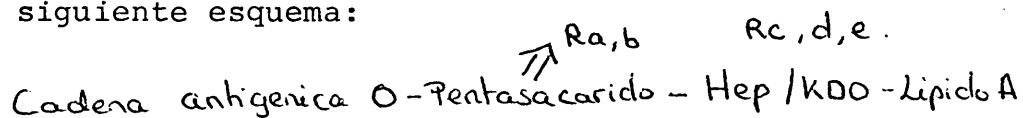
Se han encontrado mutantes Ra que o bien carecen de la síntesis de la TDP-ramnosa, o son deficientes en la fosfo-

manosa-isomerasa, o en la UDP-N-acetilgalactosamina-4-epimerasa. Los Rb pueden carecer de la galactosil-transferasa, mientras que los Rc son carentes de la UDP galactosa-epimerasa. En cuanto a los mutantes Rd, algunos, carecen de la UDP-glucosa-sintetasa, mientras que otros, no tienen la fosfo-glucosa-isomerasa o la glucosa-I-transferasa.

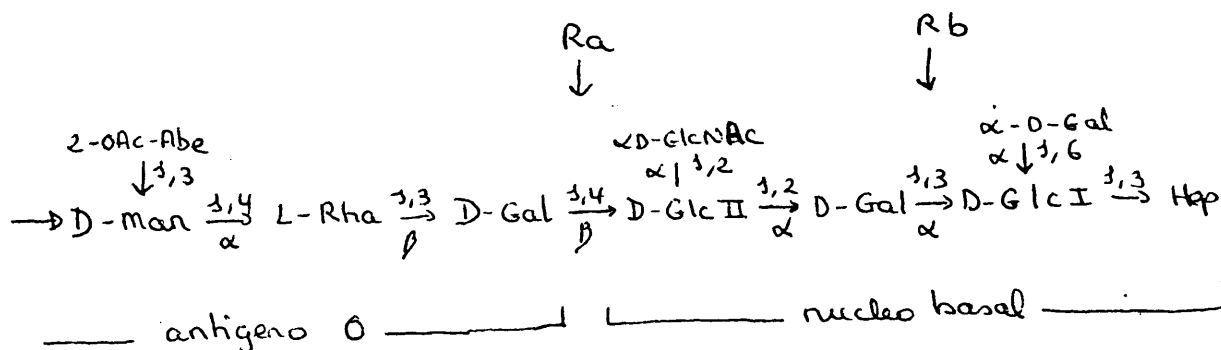
Finalmente profundizando un poco mas en la estructura del nucleo basal podemos distinguir dos partes principales

a) Estructura del pentasacárido del nucleo basal.

La estructura del pentasacarido se ha elucidado principalmente con el analisis de los lipopolisacáridos de los quimotipos Ra y Rb, mientras que los otros quimotipos han servido para evaluar la estructura del fragmento Heptosa-KDO, de acuerdo con el siguiente esquema:



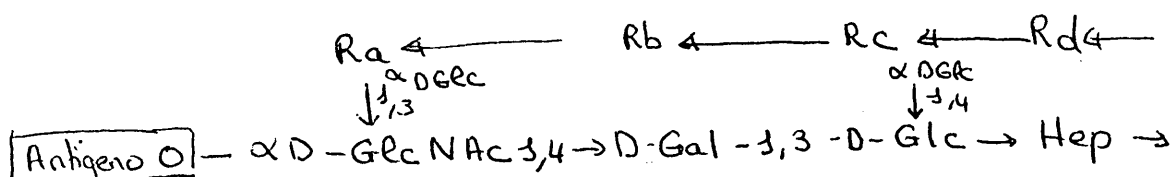
Los lipopolisacáridos de Salmonella typhimurium variedad S contienen, además del antígeno O, los 5 azucares basales y su estructura parcial es la que sigue (NIKAIDO, 1969, HAMMERLING y cols. 1970); mientras que los mutantes Ra carecen de



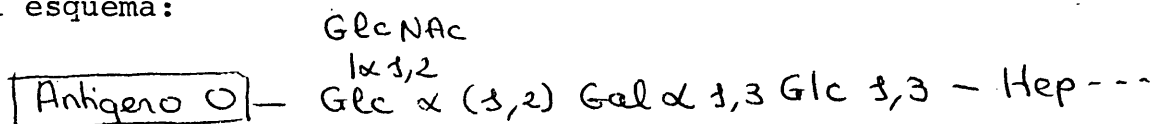
la parte correspondiente al antígeno O.

Las formas de Salmonella T2 tienen Glc II sustituida en 3 ó 4 con N-acetil-glucosamina (BRUNETEAU y cols. 1974). La S. typhimurium SR tienen un antígeno O=Abe-Man-Rha-Gal (SCHLOSS-HARDT, 1960). En el caso de S. typhimurium S el antígeno O consiste en (abe-Man-Rha-Gal)n, mientras que en Salmonella T1 es (Gal f)n, (Rib f)n. Sin embargo tanto la Salmonella S como los mutantes Ra se lisan por el fago Felix O1, mientras que los otros quimotipos no. Como hecho interesante, LINDBERG (1971) ha demostrado que el lipopolisacárido de estos microorganismos actúa como receptor de este fago y resulta esencial para que esto se efectúe, el residuo terminal de N-acetil-D-glucosamina del pentasacárido, que parece ser que actúa como punto específico de anclaje del fago. Mas recientemente, LINDBERG y SVENSSON (1975) han encontrado mutantes de S. typhimurium resistentes al fago Felix O, sin pérdida del carácter liso.

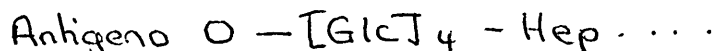
También se han encontrado mutantes rugosos de Shigella flexneri que -de acuerdo con la composición de azúcares del pentasacárido del LPS- pertenecen al quimotipo (JOHNSTON y cols. 1968). La secuencia de azúcares encontrada en este caso es:



Por otra parte, el lipopolisacarido de E. coli 0111: B4 (EDSTROM y HEATH, 1967) tiene una estructura de acuerdo con el esquema:



mientras que la delmutante E. coli K-12, según BOMAN y MONNER (1975) es:



También el E. coli BB tiene una estructura muy parecida a ésta (PREHM y cols. 1975).

Investigaciones con el lipopolisacárido de E. coli 0100, realizadas por HAMMERLING y cols. (1971), dan como resultado una estructura para el pentasacárido similar a la del S. typhimurium expuesta anteriormente.

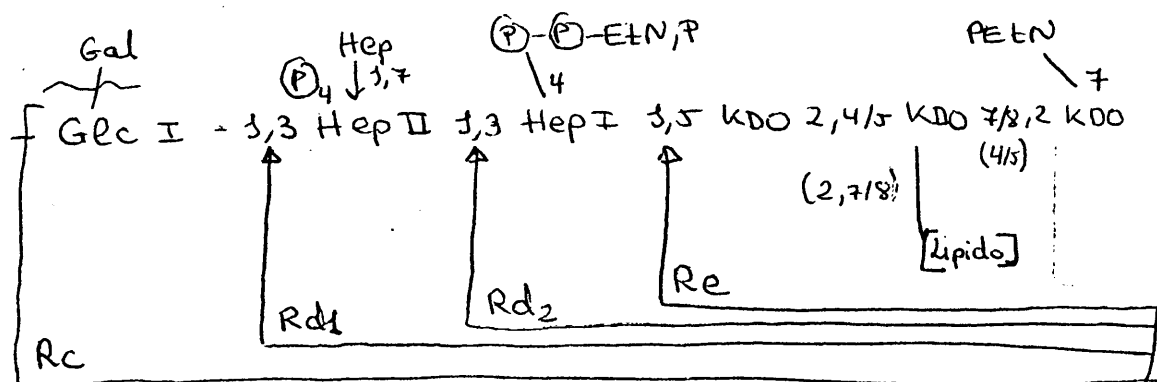
Y concluyendo, los mutantes Ra de Salmonella estan caracterizados por las siguientes propiedades: sus lipopolisacaridos contienen en nucleo basal completo perteneciente al quimotipo Ra, son sensibles a fagos tales como el Felix 01 y no sintetizan el hapteno-O. Otros géneros tienen nucleos basales de un quimotipo diferente.

Asimismo se han encontrado en el gen. Salmonella dos mutantes Rb, en los que la estructura del nucleo basal de su LPS esta expresada en el esquema general de S. typhimurium (OSBORN, 1968). Estos mutantes sintetizan el hapteno-O, pero no son capaces de transferirlo al nucleo basal incompleto del

lipopolisacárido. También puede ocurrir que tengan la glucosa II, a la cual se unen las cadenas laterales O. En este caso, la transferencia no se produce debido a que ésta, es dependiente de la presencia del residuo N-acetil-glucosamina, que no existe en estos mutantes.

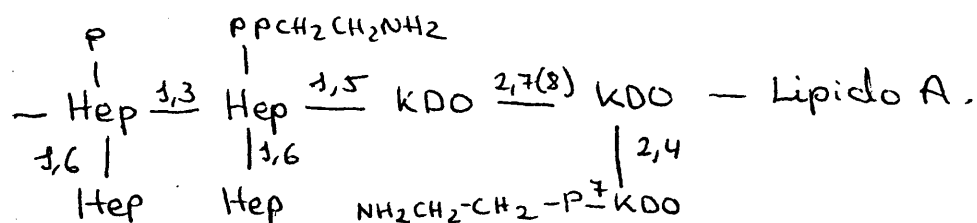
b) Estructura del fragmento Hetposa-KDO. Por análisis de mutantes que sintetizan sólo una parte del núcleo, se ha podido obtener información de la estructura de la parte interna del núcleo de los lipopolisacáridos de Salmonella. Los análisis se realizaron sobre lipopolisacáridos con fosfato (P^+), y sobre glicolipidos (P^-), que tienen un menor contenido en fosfato debido a que sus cadenas de carbohidratos no están unidas entre sí por puentes de diéster -fosfato.

La estructura más general de este fragmento, en el caso del gen. Salmonella así como la de sus mutantes rugosos con núcleo interno incompleto, es:

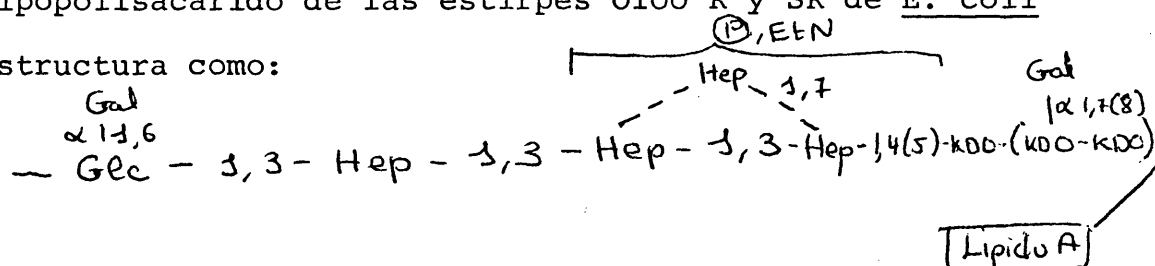


Esta estructura fue sugerida por DROGE y cols. 1970 y HAMMERLING y cols. 1973. La parte interna de la región basal P^+ es muy similar a la del lipopolisacárido de Shigella flexneri (SIMMONS, 1971).

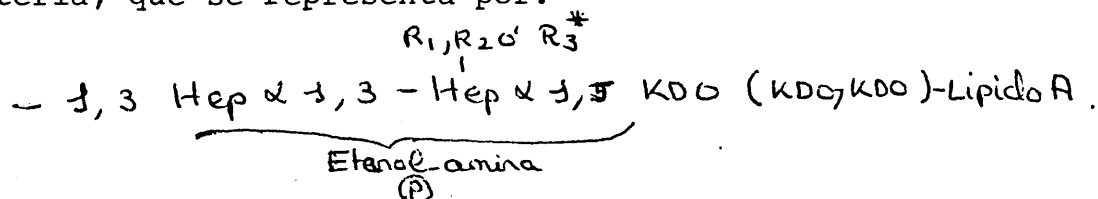
El lipopolisacárido de E. coli BB tiene una estructura del fragmento heptosa -KDO (PREHM y cols. 1975)



HAMMERLING y cols. (1971) proponen, para la región Hep-KDO del lipopolisacárido de las estirpes O100 R y SR de E. coli una estructura como:

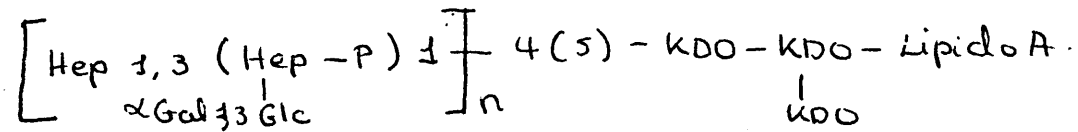


Después de los estudios de EDSTROM y HEATH (1967), sobre el lipopolisacárido de E. coli O111: B4, MORRISON y LEIVE (1975) basandose en resultados anteriores y en los suyos propios, proponen una estructura para el fragmento Hep-KDO de esta bacteria, que se representa por:

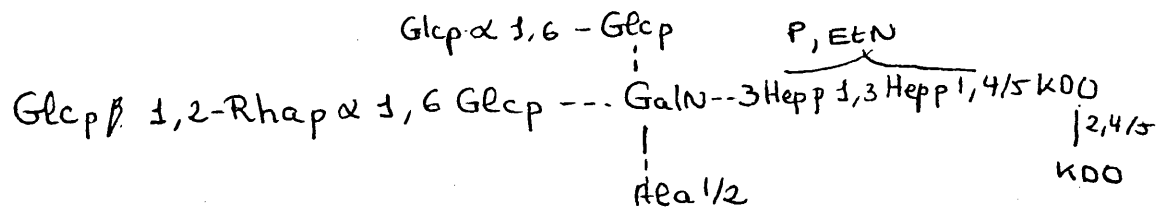


* R₁ = O, R₂ = Glc 1,4 GlcNH₂, R₃ = Hep

Por lo tanto, como resumen, FULLER y cols (1973) sugieren tres posibles estructuras del nucleo basal para estas estirpes mientras MORTON y STEWART (1972) opinan que la estructura parcial del nucleo basal del LPS de E. coli ATCC 12408 podría presentarse por el esquema:



En el caso de Pseudomonas aeruginosa se han hecho estudios sobre composición química bastante extensos, aunque no hemos observado muchos progresos en relación con la estructura. Recientemente, DREWRY y cols. (1975) proponen una estructura parcial del polisacarido del nucleo basal del lipopolisacrido de Ps. aeruginosa NCTC 1999 que se representa como sigue:



Hep = L-glicero-D-mano-heptosa

KDO = ácido 3-deoxy-2 octulonico. u octulosonico

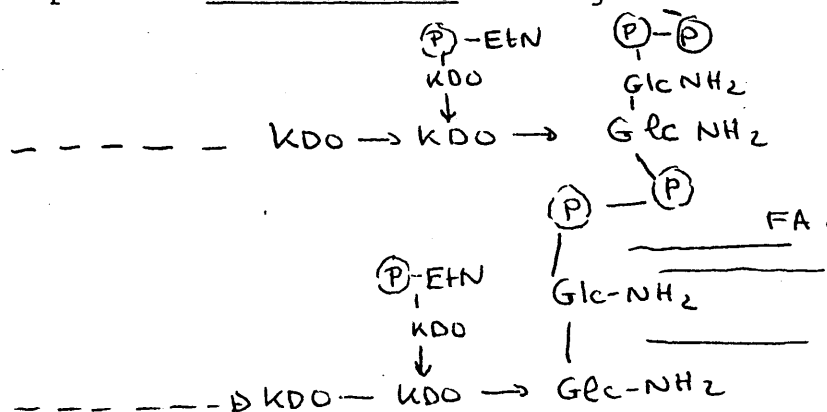
EtN = etanolamina

P = fosfato

3. Estructura del lípido A

El lípido A resulta ser componente de lipopolisacáridos y glicolípidos en las formas bacterianas S y R no habiéndose identificado mutantes que sean incapaces de llevar a cabo su biosíntesis. A esta región se debe la capacidad mitogénica y adyuvante (CHILLER y cols. 1973) del lipopolisacárido así

Por otra parte LUDERITZ y cols. (1973), proponen una estructura para el lípido A que es semejante a la de un glicolípidio de Salmonella RC con algunas variaciones:



Las figuras 10,11,12 representan la estructura completa de los LPS pertenecientes a Salmonella typhimurium, Shigella flexneriy E. coli o111:B4, según los datos obtenidos hasta la fecha.

Actualmente el lípido A es la región del lipopolisacárido menos conocida, por tanto queda por dilucidarse todavía su estructura completa así como muchos puntos oscuros acerca de su biosíntesis. Otro problema de gran interés es la acusada polidispersidad de pesos moleculares del lipopolisacárido debido a su gran agregación en solución, así como la posible unión covalente de éste a otros componentes de la membrana. Puede ser posible que el lipopolisacárido se sintetice sobre un lípido A unido covalentemente a una proteína y, posteriormente, puede romperse esta unión en alguna otra etapa de la biosíntesis.

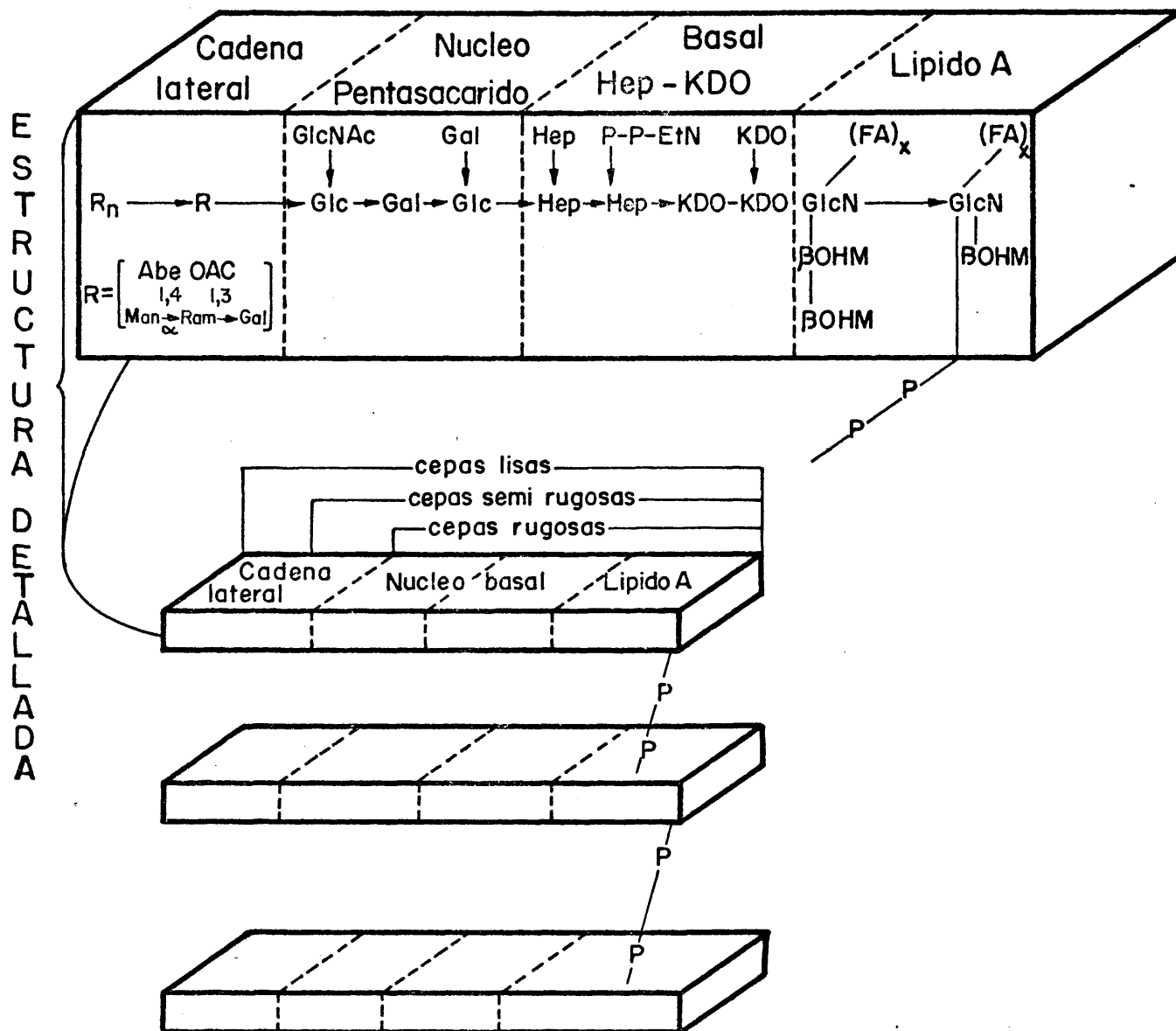


Fig. 10.- Estructura del lipopolisacarido de *S. typhimurium*
 Simbolos: Abe, abecuesa; Man, D-manosa; Glc, D-glucosa;
 Gal, D-galactosa; GlcNAc, N-acetil-D-glucosamina;
 Hep, L-glicero-D-manoheptosa; KDO, ácido 2-aceto-
 -3 deoxioctulosónico; EtN, etanolamina; P, fosfato;
 FA, ácidos grasos; β -OHM, ácido β -hidroximirístico;
 GlcN, D-glucosamina; $n \approx 10$.

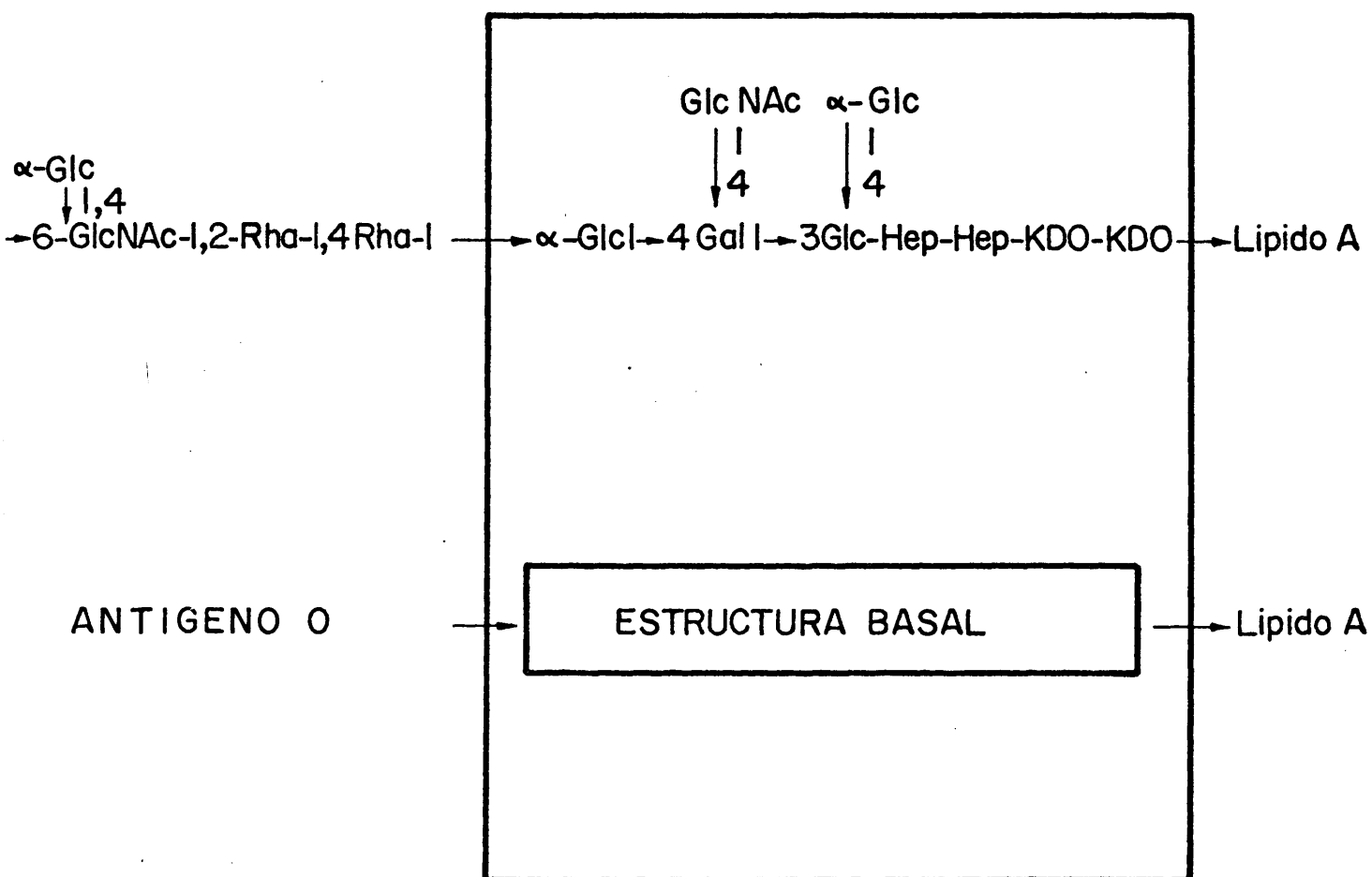
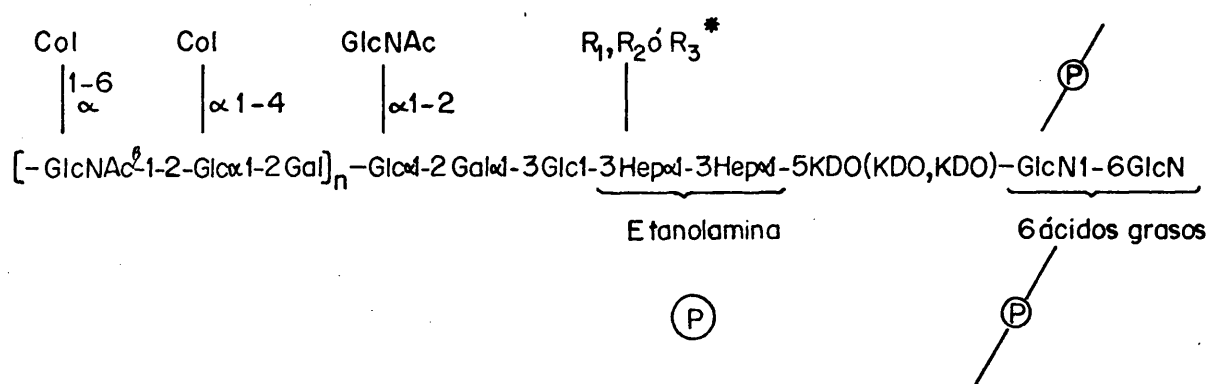


Fig. 11.- Estructura del lipopolisacarido de *Shigella flexneri*. En este esquema se utilizan los mismos símbolos que en la figura anterior.



└─ Cadena antigénica O ─┐ ┌────────── núcleo basal ───────────┐ ┌─ Lípido A ─┐

* $R_1 = \text{O}$; $R_2 = \text{Glc}1 \rightarrow 4\text{GlcNH}_2$; $R_3 = \text{Hep}$; $n \approx 11$

Fig. 12.- Estructura del lipopolisacarido de *E. coli* O111:B4
(ver símbolos en las figuras 10 y 11) Col, colitosa.

V. ACCIONES ENDOTOXICAS

Los lipopolisacáridos producen un gran número de alteraciones y efectos patológicos, tanto en los seres humanos como en animales; sin embargo, está perfectamente demostrado que existen diferencias de susceptibilidad que dependen de la especie de huésped de que se trate y ello condiciona una cierta variabilidad en el tipo de las lesiones producidas. También, incluso dentro de una misma especie, pueden observarse variaciones fenomenológicas y de los tipos de lesión producidas. Ello puede ser debido a la gran variabilidad estructural y de composición que puede producirse en estas tan complejas moléculas, tanto en su origen como en su obtención y purificación.

En cuanto a las actividades endotoxicas que aquí vamos a revisar, son de muy diversos tipos, desde el simple fenómeno febril a las complejas alteraciones vasculares y hematológicas, pasando por otros problemas de interacciones metabólicas y celulares que se manifiestan dentro de cuadros infecciosos microbianos y de la respuesta inmunitaria.

1. Alteraciones en el mecanismo de termo-regulación.

Resulta perfectamente demostrado que las endotoxinas son unos pirógenos muy activos, tanto en el hombre como en los animales. La dosis mínima efectiva depende de la molécula endotóxica utilizada y del criterio que se siga en la valoración de la respuesta febril. GREISMAN y HORNICK (1969) han hecho un estudio comparativo de la respuesta pirogénica en hombre y conejo y han comprobado que, en el primer caso, la reacción era mucho mas acentuada. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos mas recientemente con otras endotoxinas (WOLFF, 1973) y debido a esta mayor susceptibilidad específica es muy difícil reproducir en el hombre todos los efectos observados en los animales.

El periodo de latencia entre la inyección de antígeno y la aparición de fiebre es de 90-120 minutos en el hombre y de 15-30 minutos en el conejo, dependiendo de la dosis; la duración del cuadro febril es de unas 3-4 horas en el hombre y de unas 4 horas en conejo .

La fiebre, según algunos autores (ATKINS y SNELL, 1965 SNELL y ATKINS, 1968) se produce por la endotoxina pero de una manera indirecta; según parece, se origina por medio de una sustancia intermediaria, -el pirógeno endógeno- (EP), que se libera de los granulocitos como respuesta a la presencia de la molécula endotóxica. En el hombre, la respuesta frente a pirógenos endógenos se diferencia fácilmente de la de endotoxinas por la gran diferencia que existe en el periodo de latencia de estos ultimos. En conejo, sin embargo, esta diferencia es menos acusada, pero resulta también perfectamente observable (SNELL y ATKINS, 1967). Todos los pirógenos, incluido el endogeno, al inyectarlos en conejo en dosis adecuadas dan lugar a una respuesta de tipo bifásico aunque este fenómeno no se puede observar

en el hombre debido a que, en la especie humana, esta respuesta es monofásica. ATKINS (1960) sugiere que la primera onda de respuesta a los pirógenos exógenos se debe a una molécula o porción molecular con carácter de pirógeno endógeno que induce la liberación posterior de nuevo pirogeno endogeno y paralelamente una segunda onda de fiebre. BENNET y cols. (1957), sin embargo, consideran que el primer pico se debe a la acción directa de la endotoxina sobre el sistema nervioso central. Simultáneamente a la aparición de fiebre aparece taquicardia, escalofríos, dolor de cabeza, náuseas y vómitos. Algunas endotoxinas como la de E. coli producen más náuseas que otras (como la de Pseudomonas, por ejemplo)

Hay varias observaciones que hablan en favor de que el pirógeno endógeno del granulocito es un intermediario esencial de la fiebre endotóxica. Durante la estimulación "in vitro", por endotoxina, de granulocitos se libera (EP) en cantidades y velocidad semejantes a la respuesta producida "in vivo" frente a la endotoxina. Conejos con agranulocitosis producida con mostaza nitrogenada, no responden a la endotoxina pero sí al (EP). Los experimentos de respuesta frente a pirógenos inyectados en la arteria carótida o en el hipotálamo sugieren que el (EP) tiene una acción directa en las estructuras nerviosas, mientras que la endotoxina no (COOPER y cols. 1967)

El pirógeno endógeno puede ser detectado por distintos procedimientos; así se puede conseguir "in vivo" -en caso de peritonitis- a partir de exudados estériles e infectados de la linfa del conducto torácico, también en muestras de sangre o de tejidos después de un estímulo endotóxico apropiado

y en pequeñas cantidades de cualquier tejido de conejo sin que exista un estímulo específico. La aparición de pirógeno endógeno en exudados inflamatorios humanos confirma el papel de este agente en la fiebre clínica. El origen celular de este (EP) no puede edfinirse con exactitud. En experimentos "in vitro" se ha obtenido (EP) de granulocitos (de muestras de sangre y exudados), de células mononucleares (de sangre, exudados, bazo, nódulos linfáticos, y pulmon), y de las células kúpffer del hígado. Esta variedad de origen puede explicar la aparición de fiebre en las agranulocitosis humanas y también sugiere la conexión entre la fiebre clínica y el tipo de reacciones histológicas mononucleares encontradas en algunos tipos de enfermedades crónicas granulomatosas.

Los sistemas "in vitro" están influidos por factores tales como electrolitos. La liberación de (EP) por los granulocitos resulta dependiente de algunas enzimas, pero independiente de la glicolisis y de oxígeno. Asimismo, es bloqueada por inhibición de la síntesis de proteínas y puede ocurrir que, esta liberación de (EP), sea una parte de la reacción celular de tipo general como sucede con la degranulación y liberación de proteasas, y con los enzimas lisosomales. Bajo circunstancias parecidas a esta liberación del (EP) también se libera, de los granulocitos, un factor capaz de inducir reacciones inflamatorias.

Estudios fisicoquímicos del (EP) granulocítico revelan que es una proteína con un peso molecular entre 10.000 - 20.000 d, conteniendo poco carbohidrato y probablemente sin lípidos.

Recientemente, FELDBERG (1974) sugiere que los lipopolisacáridos bacterianos actúan indirectamente sobre la porción anterior del hipotálamo, produciendo fiebre. Existen pruebas que hablan en favor de que estas moléculas incrementan la síntesis y liberación de prostaglandinas de la serie E, principalmente en el fluido cerebroespinal y resultando ser éstas, por tanto, las verdaderas mediadoras de las respuestas pirogénicas. FERREIRA y VANE (1974) encuentran que antipiréticos tales como la indometacina actúan sobre la síntesis de prostaglandinas inhibiéndola y por tanto bajan la fiebre.

MYERS y cols. (1974) estudian la fiebre producida por una inyección de endotoxina en el hipotálamo de mono, y observan que esta fiebre está mediada por completo por una acción sobre el sistema nervioso central, siendo el lugar más sensible el área preóptica del hipotálamo anterior.

La primera fase de la fiebre bifásica es debida, o bien a la acción directa del pirógeno sobre las células del hipotálamo anterior o a una liberación secundaria en esta región de una sustancia termogénica intermediaria: una prostaglandina o la 5-hidroxitriptamina (5HT). Sugieren que la endotoxina en sangre puede elevar el nivel de prostaglandinas en el hipotálamo, esto retrasaría la liberación de noradrenalina en el hipotálamo anterior pero incrementaría la salida de 5HT. El 5HT activa los mecanismos de aumento de temperatura que están mediados por acetil-colina. Al mismo tiempo, la endotoxina en el plasma circulante modifica el flujo normal de iones Na^+ y Ca^{2+} del hipotálamo posterior, dando lugar a alteraciones en el transporte de estas células.

FELDBERG y SAXENA (1975) hacen un estudio comparativo del efecto de prostaglandinas, endotoxina y lípido A en la temperatura corporal de ratas. En estos animales, al inyectarles endotoxina o lípido A, intravenosamente, ocurre un descenso de la temperatura; al contrario de lo que ocurre en perro, gato, conejo, etc. Sus resultados indican que las prostaglandinas parecen no estar implicadas en esta respuesta hipotérmica; el lípido A o la endotoxina no llegan a entrar en el tejido cerebral, ya que cuando se inyectan directamente en él hay una producción de fiebre. Puede ocurrir que la acción de la endotoxina sea directamente sobre los capilares de la piel, dilatándolos y produciendo por tanto una disminución de temperatura.

Por otra parte, la fiebre puede ser una respuesta a un antígeno en un huesped inmunizado específicamente; algunos autores han sugerido que la respuesta a la endotoxina es de esta forma. La fiebre puede ser el resultado de una hipersensibilidad mediada por anticuerpos o de una hipersensibilidad retardada. La primera de ellas esta asociada a anticuerpos circulantes del tipo 7s. Se han podido obtener pruebas en favor de la hipersensibilidad retardada, disociando por distintos procedimientos, en animales inmunizados la respuesta de anticuerpos de la respuesta febril. Esta respuesta se puede transferir pasivamente a animales no inmunizados por medio de células de nódulos linfáticos de un huesped específicamente inmunizado. A veces la respuesta febril se halla asociada a una hipersensibilidad de la piel. La tuberculina, la toxina de la difteria, y filtrados de cultivos de estafilococos y de Cryptococcus albicus son capaces de originar este tipo de fiebre.

Se ha demostrado la presencia de (EP) durante algunos tipos de fiebre hipersensible y parece probable que sea el mediador en todas las fiebres inmunes. A pesar de las semejanzas, no es probable que la fiebre endotóxica sea una respuesta de hipersensibilidad; ya que esta tiene una serie de características propias que le diferencia de la endotoxina; por ejemplo, necesita sensibilización previa, sólo un 50-75% de los animales inmunizados muestran una respuesta febril a la inyección de antígeno, el periodo de latencia es de 45 minutos o más, el bloqueo de sistema reticulo endotelial no modifica la respuesta y por último, la tolerancia se puede inducir rápidamente y sólo por un antígeno específico.

El fenómeno de tolerancia a la fiebre ha sido muy estudiado tanto en hombre como en animales. El hombre desarrolla tolerancia a una determinada dosis de endotoxina muy rápidamente, observándose diferencias en 24 horas. La respuesta febril desaparece totalmente en el hombre, mientras que en conejo, durante el estado de tolerancia, se mantiene una curva de fiebre monofásica, disminuyendo el segundo pico (paralelamente a la respuesta en humanos), pero manteniéndose el primero. En el hombre, igual que en el conejo, es desconocido el mecanismo por el cual se desarrolla una tolerancia. La función del sistema reticulo endotelial (RES) no se incrementa en el hombre (GREISMAN y cols. 1964) como ocurre en el conejo (BEESON, 1947). Es bastante improbable el desarrollo de tolerancia debida únicamente a anticuerpos humorales, ya que se ha podido desarrollar tolerancia en pacientes agamaglobulinémicos; WOLFF (1973) obtiene resultados similares.

La tolerancia en el hombre, así como en el conejo, es relativa; no absoluta, y por una inyección posterior con una dosis mayor de endotoxina, puede dar lugar otra vez a una respuesta febril (GREISMAN y cols. 1964).

GREISMAN y HORNICK (1973) sugieren que la segunda onda de respuesta febril en el conejo puede ser debida a la liberación de (EP) por las células hepáticas de Küpffer principalmente, ya que estas constituyen en gran parte el sistema retículo endotelial encargado de eliminar la endotoxina inyectada. La tolerancia puede deberse a la resistencia de dichas células a liberar el (EP); y este (EP) se puede liberar también de granulocitos de pulmón, y de macrofagos peritoneales.

ATKINS y FRANCIS (1973) sugieren que los linfocitos, después de ser incubados con endotoxina, pueden activar los leucocitos de la sangre para que liberen EP.

Una inyección intravenosa de endotoxina, a diversos intervalos, da lugar a una inducción de tolerancia pirogenica, en la cual intervienen dos mecanismos distintos (MILNER, 1973) con una primera fase temprana de tolerancia, semejante a la que se obtiene por una infección continuada del antígeno. Esta tolerancia es específica de endotoxinas como clase, no está asociada con incrementos de anticuerpos anti-endotoxina y puede ser inducida por endotoxinas que carecen de antígeno O. Esta tolerancia, obtenida después de una inyección de endotoxina, se pierde a las 48 horas y no se puede transferir pasivamente, aunque vuelve a aparecer un estado de tolerancia más tardío, que no está relacionado con la respuesta febril inicial.

Esta última fase de tolerancia se ha encontrado también en el hombre (GREISMAN y cols. 1969). Inyecciones de lipopolisacáridos, administradas muy próximas (o en infusiones continuadas) dan lugar a la puesta en marcha del mecanismo de resistencia celular, obteniéndose una tolerancia rápida, que se mantiene sin necesidad de anticuerpos. Sin embargo, si el intervalo entre las inyecciones de antígeno se va aumentando, la tolerancia se hace mas dependiente de los anticuerpos anti-endotoxina. Este segundo estado exhibe algo de la especificidad O, y es mas duradero que el anterior.

Este estado de tolerancia pirogénica a la endotoxina, se puede transferir con suero y con fracciones de suero exentas de pirógenos, tanto en animales (GREISMAN y cols. 1969) como en el hombre (GREISMAN y cols. 1964).

En este mismo laboratorio de GREISMAN y HORNICK (1973), se ha estudiado la especificidad de los factores humorales de esta tolerancia a la fiebre, observando que estan dirigidos hacia los antígenos O de la endotoxina y que pertenecen al grupo de anticuerpos del tipo IgM e IgG. Cuando se utilizan para la inmunización lipopolisacáridos de mutantes rugosos, el antisue-ro resultante (anticuerpos frente al nucleo basal) se produce una protección muy grande frente a endotoxinas heterólogas.

Si se inmuniza con lipopolisacáridos de cepas lisas, los anticuerpos protectores reaccionan contra el antígeno O mas especificamente, ofreciendo una menor protección.

Los mecanismo de tolerancia a endotoxinas siguen funcionando a pesar del bloqueo del sistema reticulo endotelial; así por ejemplo, los anticuerpos frente a endotoxinas

continúan contribuyendo en este mecanismo, ya que el suero de un animal tolerante y bloqueado transfiere la protección, frente al proceso febril, a un animal normal bloqueado.

Recientemente, GREISMAN y DuBUY (1975), a la vista de los resultados obtenidos anteriormente por BRAUDE y DOUGLAS (1972) y otros autores, así como los suyos propios, concluyen que la tolerancia a la fiebre está basada principalmente en la resistencia de las células del sistema retículo endotelial, susceptibles a la endotoxina, a liberar pirógeno endógeno y que aumentos en el aclaramiento ("clearance") de la sangre, representan sólo un mecanismo protector accesorio por el cual, la endotoxina se transporta más eficientemente a estas células resistentes que la fagocitan y neutralizan su acción.

GREISMAN y cols. (1975) estudian el papel del bazo en la tolerancia a la fiebre. Estos autores observan que no tiene un papel importante en la etapa inicial, pero sí en la fase tardía en la que intervienen la síntesis de anticuerpos como mecanismo protector.

2. Reacción localizada y generalizada de Shwartzman

La reacción localizada de Shwartzman se puede originar por dos inyecciones, la primera intradérmica y la segunda intravenosa, de endotoxina (con un intervalo de 24 horas) tanto en conejo como en otros animales. A las 4 horas aproximadamente de la última inyección aparecen las lesiones características del proceso, principalmente una coagulación intravascular local (LEE y STETSON, 1965). En esta reacción parece ser que los leucocitos juegan un papel muy importante ya que si son destruidos

por la acción de los rayos X ó por mostaza nitrogenada, la reacción resulta inhibida. Asimismo (THOMAS, 1964) observó que se puede reproducir la reacción si se le añade a la primera inyección de endotoxina lisosomas de leucocitos intactos (esta reacción no tiene lugar si se añaden inhibidores de proteasas). También intervienen en esta reacción los mecanismos de coagulación. THOMAS (1956) ha visto que la heparina inyectada junto al lipopolisacárido puede inhibir la reacción, mientras que si se utiliza epinefrina se producen lesiones necróticas. De aquí la importancia que puedan tener los agentes vasoconstrictores en estas reacciones cutáneas.

La inyección intravenosa de dos dosis subletales de endotoxina en conejo, con un intervalo entre ellas de 24 horas, produce una trombosis glomerulo-capilar, que da lugar finalmente a una necrosis renal (LEE y STETSON, 1965) y esto es lo que se denomina reacción de Shwartzman generalizada. Hay otras formas de inducir esta reacción, tales como, el tratamiento con inhibidores de la fibrinólisis, anticuerpos contra plaquetas, productos obtenidos de granulocitos, antígenos (en animales sensibilizados) etc.

Muchos autores han sugerido que algunos de los efectos fisiológicos de la inyección de endotoxina se deben a su actuación sobre los mecanismos de coagulación (RATNOFF, 1969). La endotoxina tiene efectos sobre la iniciación de la agregación de plaquetas (DES PREZ y cols. 1961), activa el factor XII (factor de Hageman) (RATNOFF, 1969) e interviene en la activación del complemento (MERGENHAGEN y cols. 1969). LIPINSKI y cols. (1969) observaron que la capacidad fibrinolítica resulta muy reducida después de una inyección de endotoxina. Sin embar-

go una sola inyección de endotoxina, en un animal normal, tan sólo produce una pequeña coagulación intravascular, pero sin llegar a ocurrir una trombosis significativa. ¿cuales son los cambios sufridos en el huesped para que se origine una hipercoagulabilidad en el momento que recibe una segunda inyección de endotoxina?

HORN en 1973 ha revisado ampliamente este tema, recogiendo datos en favor de que los granulocitos se hallan también implicados en la reacción generalizada de Shwartzman. Animales con granulocitopenia, inducida con mostaza nitrogenada, no son susceptibles a esta reacción (THOMAS y GOOD, 1952). La transfusión de granulocitos, la infusión de gránulos procedentes de leucocitos polimorfonucleados (o del sobrenadante resultante de la rotura de estos) induce a un estado inmediato preparatorio para la reacción generalizada de Shwartzman; en este estado, una sola inyección de endotoxina puede producir una coagulación masiva (HORN y COLLINS, 1968). Estos experimentos indican que la primera inyección de endotoxina produce granulocitosis en el huesped, haciendolo muy susceptible a la coagulación y liberandose granulocitos inmaduros de la medula osea. Estos autores sugieren que algunos componentes de los granulocitos (proteinas cationicas lisosomales p. ej.), en presencia de endotóxina, pueden interaccionar con los complejos formados por monómeros de fibrina que son solubles, dando lugar a la formación de un coagulo fibroso, parecido al de fibrina (para-coagulación) que caracteriza a la reacción de Shwartzman generalizada.

Finalmente sugieren un posible mecanismo para esta reacción. La primera dosis de endotoxina induce la conversión de fibrinogeno en fibrina, formandose coagulos, que son eliminados por el sistema reticulo endotelial, antes de que se depositen en los capilares glomerulares o en otros vasos. Esta dosis, probablemente, condiciona a este sistema reticulo endotelial, de tal manera, que disminuye su actividad fagocítica quedando ésta bloqueada totalmente con una segunda dosis.

BRAUDE y cols. (1973) logran tratar en conejos la reacción generalizada de Shwartzman con una inyección de antisuero contra endotoxina, administrandola 2 horas antes de la segunda dosis de ésta, o bien, prevenir la coagulación intravascular diseminada mediante una inyección que se administra 96 horas antes de la primera dosis, con lo que disminuye la reacción del 90% al 18%. La coagulación intravascular también puede abolirse con anticuerpos contra bacterias heterologas y de mutantes deficientes en cadenas laterales. Esta protección pasiva perdura durante unos 30 dias. El antisuero evita el descenso brusco de fibrinógeno y de plaquetas que acompaña a la acumulación de fibrina en los glomerulos y en otras partes. Sugieren estos autores que esta protección es independiente de anticuerpos anti-antígeno O, no requiriendo complemento. Con este tratamiento no se produce tampoco la reacción local de Shwartzman, evitandose así la necrosis epidérmica.

3. Alteraciones vasculares, producida por lipopolisacaridos

En las endotoxemias también se producen lesiones hemorrágicas debido a un incremento de sensibilidad a la epinefrina según comprobaron NETER y cols. (1960). Este mismo efecto se produce frente a serotonina (WEINER y ZWEIFACH, 1966).

También BITENSKY y cols. (1971), observan que el incremento que se obtiene en la susceptibilidad tisular a catecolaminas, al inyectar endotoxina, puede ser debido a la activación de la adenilato-ciclasa. En membranas de hígado de ratón el LPS de E. coli produce una estimulación selectiva de la adenilato ciclasa-sensible a epinefrina. SPITZER (1974) observa un incremento de AMP cíclico en células de tejido adiposo tratados con endotoxina, especialmente después de la estimulación con norepinefrina.

Por otra parte, HOWES y MCKAY (1975) estudian el efecto de la endotoxina sobre la permeabilidad ocular y comprueban que cantidades muy pequeñas de esta sustancia producen una hiperemia ocular. A dosis mas altas se obtiene una clara prolongación de este efecto, y este incremento de permeabilidad se debe, principalmente, a la liberación de histamina y también, seguramente, de serotonina a partir de las células cebadas, ya que el tratamiento con antihistamina y antiserotonina reduce la permeabilidad vascular en el globo ocular.

SPINK y cols. (1964) también han observado esta liberación de histamina después de una inyección de endotoxina.

El tratamiento con endotoxina puede producir también una necrosis tumoral hemorrágica (MIHICH y cols. 1961) y unas lesiones en la placenta que originan abortos o partos prematuros (MCKAY y WONG, 1963).

Asimismo, las moléculas de lipopolisacáridos inducen, por una serie de mecanismos distintos, la producción de bradiquidina que es un polipéptido vasodilatador que incrementa la

permeabilidad de las membranas; la bradiquina se puede formar en el plasma (in vitro), en presencia de complemento y anticuerpos 19S contra una endotoxina. La fracción correspondiente al polisacárido de la endotoxina es la responsable de la activación de las calicreinas del plasma (MILLER y cols. 1973); y la interacción de la endotoxina con los leucocitos, pone en marcha una serie de mecanismos que, posiblemente, inducen la formación de quininas: fagocitosis, seguida de liberación de enzimas lisosomales y citoplasmicas, iniciación de la coagulación por la vía del factor de Hageman, generación de tromboplastina y activación del plasminógeno. Los granulocitos de primates (a diferencia de los de conejo), contienen un activador de calicreina o calicreina citoplásmica, que puede quedar liberado cuando la endotoxina es fagocitada.

4. Alteraciones hematológicas de origen endotóxico.

Los lipopolisacáridos pueden producir también alteraciones de sistema hematopoyético tales como leucopenia, leucocitosis y cambios en los mecanismos de coagulación y fibrinolíticos (GANS y KRIVIT, 1961; TRENTIN, 1967). Al principio, se produce un descenso del número de linfocitos y granulocitos circulantes, seguido de una leucocitosis, que es debida principalmente al incremento de granulocitos. Esta granulocitosis secundaria depende de la existencia de células en las reservas de la médula osea. De aquí que, las endotoxinas se hayan utilizado en clínica para estimar las reservas de granulocitos de médula osea (HERION y cols. 1965).

El procedimiento resulta particularmente interesante, para estimar las reservas de granulocitos en médula osea, duran-

te la quimioterapia citotóxica (FINK y CALABRISI (1962), en el estudio de neutropenias (DALE y WOLFF, 1973) y en la investigación de algunos aspectos humorales de la regulación de granulocitos.

La leucocitosis en humanos resulta un indicador muy fiel de la sensibilidad a las endotoxinas, ya que el fenómeno se produce con dosis subpirogénicas (WOLFF y cols. 1965, MECHANIC y cols. 1962). Se ha demostrado también que esta leucocitosis inducida por endotoxinas es subsiguiente a la liberación de granulocitos de las reservas de la médula osea (ATHENS y cols. 1961).

JENKINS y cols. (1971) estudian el efecto del tratamiento con endotoxina sobre la repoblación hematopoyética de ratones irradiados subletalmente y observan que en animales tratados con LPS, la repoblación es mayor, principalmente en lo que se refiere a colonias de granulocitos, mientras que las colonias eritropoyéticas se incrementan en números absolutos pero no así en los valores relativos. También FRUHMANN (1966) observa alteraciones de la eritropoyesis en animales tratados con endotoxina.

Por otra parte, CHERVENICK y LOBUGLIO (1972), han encontrado que los leucocitos de sangre periférica, y de tejidos, son los responsables de la producción de un factor estimulador de clones mieloides ; principalmente los monocitos y macrófagos maduros. Sin embargo, los linfocitos, granulocitos, plaquetas y eritrocitos normalmente no producen dicho factor. Después de la administración de endotoxina "in vivo", hay un incremento muy grande de actividad del factor estimulador de

clones de células mieloides (CHERVENICK, 1972). Esto podría explicar la extensa granulopoyesis que ocurre después en la endotoxemia. Sin embargo todavía no se ha caracterizado muy bien el papel de este factor en el control de la granulopoyesis "in vivo". CLINE y cols. (1975) estudian el efecto de la endotoxina sobre la producción -por monocitos y macrofagos- del factor estimulante. Así, la endotoxina activa la producción de este factor por los macrofagos, pero no tiene efecto alguno sobre los monocitos.

En animales, con dosis altas de endotoxina se produce neutropenia, mientras que en el hombre no se ha podido observar este efecto (WOLFF y cols. 1965, MECHANIC y cols. 1962, KIMBALL y cols. 1972). Los estudios realizados por CHERVENICK y cols. (1967) indican que la endotoxina produce en ratón liberación de neutrofilos de la medula osea y también, las investigaciones de BOGGS y cols. (1968), sugieren que en humanos la endotoxina produce la liberación de un factor en el plasma capaz de inducir una neutrofilia significativa. CORRIGAN y cols (1974) logran reducir esta neutrofilia en clínica mediante tratamientos con sulfato de polimixina. Este antibiótico neutraliza la toxicidad del LPS, inhibiendo también otras reacciones endotóxicas tales como la leucopenia, la trombocitopenia, la coagulación intravascular y la reacción de Shwartzman, según se ha comprobado en conejos.

Asimismo puede aparecer trombocitopenia después de una inyección intravenosa de endotoxinas (SPIELVOGEL, 1967). WOLFF y BENNET (1974) observan un descenso notable en el número de plaquetas en enfermos con endotoxemia.

Recientemente HAWIGER y cols. (1975) han comprobado la existencia de un receptor -especifico para endotoxinas- en la membrana de las plaquetas humanas. En la interacción del LPS con este receptor se producen dos efectos principales: a) liberación de 5-hidroxitriptamina (5-HT) que tiene una actividad vascular; y b) desenmascaramiento del fosfolípido de las plaquetas, lo que produce un efecto sobre la coagulación. Por otra parte, cuando hidrolizamos con tripsina las inmunoglobulinas G y el complemento, que se encuentran absorbidos a las plaquetas, se observa que no se produce inhibición de la interacción entre la endotoxina y el receptor; por lo tanto, además de la activación indirecta de las plaquetas por el LPS endotóxico (en la que intervienen complejos endotoxina-anticuerpo unicamente o bien estos complejos mas complemento a través de receptores para el fragmento FC de las IgG y del complemento) existe otra via directa de activación a través de los receptores para endotoxina.

La interacción puede realizarse a través del lípido A (LUDERITZ y cols. 1973). En las plaquetas, además de este receptor, existe el específico del ADP, el de la 5-HT (MICHAL, 1969) el del fragmento FC de la IgG (HENSON y SPIEGELBERG, 1973) y otros. Como puede verse, las alteraciones hemáticas originadas por los LPS son muy complejas y así otros investigadores, en endotoxemias, han observado -en distintos animales- algunas anormalidades que afectan a los factores de coagulación; por ejemplo, un descenso en el nivel del fibrinogeno que va seguido de una elevación al cabo de cierto tiempo. Esto parece deberse a que el lipopolisacarido actua sobre los leucocitos induciendo a la liberación de activadores del plasminógeno y de enzimas lisosómicas, que activan los mecanismos de coagula-

ción (GOLDSTEIN y cols. 1971). Está demostrado que el LPS puede estimular la formación de sustancias tromboplásticas -en los leucocitos- que son capaces de activar directamente los factores VII y X, de coagulación, prescindiendo del factor de Hageman (NIEMETZ y FANI, 1971). También pueden activar el sistema intrínseco de la coagulación por medio de una liberación de enzimas a partir de los leucocitos (LERNER y cols. 1971).

También en huéspedes convenientemente susceptibles a la endotoxina, se puede producir proteína C, según indicaron PATTERSON e HIGGINBOTHAN (1965) y mas tarde PATTERSON y cols. (1968); mas recientemente, WATSON y KUSHER (1974), han sugerido que los mediadores que inducen a esta síntesis de proteína C, en el hígado, actúan condicionados por la dosis y la duración del estímulo endotóxico.

Por otra parte, KAMPSCHMIDT y SCHULTZ (1961), han estudiado los efectos de la endotoxina sobre el hierro hemático y han comprobado un claro descenso de este elemento en suero, consecuente con la presencia de LPS. Esta disminución de los niveles de hierro es bastante reproducible, hasta el extremo de que se ha sugerido utilizarlo como un bioensayo para conocer la actividad endotóxica "in vivo" (BAKER y WILSON, 1965).

Por último, la endotoxina también es capaz de actuar directamente sobre los eritrocitos sanguíneos, a través de un receptor, que ha sido aislado y caracterizado como soporte de la interacción (SPRINGER y cols. 1973, SPRINGER y cols. 1974). Estos receptores pueden tener una gran aplicación en clínica para el tratamiento de la septicemia y del shock endotóxico, así

como para evitar los abortos que pueden ocurrir en estos casos. Es lógico suponer que la acción terapéutica deberá producirse por un efecto de bloqueo o saturación de los mismos para evitar la interacción específica.

5. Acción antitumoral de los LPS

Hace pocos años, GROHSMAN y NOWOTNY (1972), comprobaron que la endotoxina de Serratia marcescens era capaz de producir una resistencia al desarrollo del tumor ascítico inespecífico TA3Ha (carcinoma ascítico de ratón). También BRAUN, en 1973, sugiere que el LPS puede presentar dos efectos sobre los tumores: uno en relación con la respuesta inmune y otro sobre las células tumorales directamente, interviniendo en todo ello modificaciones de los niveles de AMP cíclico. Mas adelante, YANG y NOWOTNY (1974), estudiando las condiciones en las que se obtiene una resistencia anti-tumoral máxima, comprueban que la actividad óptima se consigue con dosis de 10 μ g de endotoxina, inyectadas intraperitonealmente, una el día 3 antes de la inoculación del tumor y otra ese mismo día. Según se ha comprobado, la endotoxina no tiene un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales y, por otra parte, células de bazo activadas "in vitro" o "in vivo" con endotoxina, son capaces de transferir esta protección frente al tumor. Estos autores sugieren que los responsables de esta resistencia pueden ser los linfocitos o los macrófagos activados con la endotoxina. Así otros autores han descrito el efecto inhibidor del crecimiento tumoral ejercido por macrófagos activados con endotoxina (ALEXANDER y EVANS, 1971, HIBBS, 1973). También podría ocurrir que, el lipopolisacárido, active los linfocitos B induciéndolos

a sintetizar un pequeño número de anticuerpos antitumor. Estos anticuerpos específicos pueden incrementar la citotoxicidad de las células B. Sin embargo, el fenómeno de blastogénesis y el efecto antitumoral seguramente no son fenómenos que esten relacionados entre si; ya que el segundo se observa a las 5 horas de incubación, mientras que el primero tiene su máxima actividad a los tres días.

RALPH y NAKOINZ (1974) mediante experiencias "in vivo" e "in vitro" con LPS de Salmonella typhosa han demostrado la inhibición de dos tipos de tumores: un linfosarcoma de ratones BALB/C (RAW 8) obtenido "in vitro" por infección con el virus de la leucemia de Abelson y un linfoma espontaneo de células B, PU-5-1.8 (también de BALB/C). También el LPS de E. coli, así como el lípido A obtenido del mismo, han presentado propiedades antitumorales.

En cuanto a las concentraciones a las que estos LPS resultan inhibidores anti-tumorales parecen ser las mismas que actúan como óptimas para la mitogénesis de los linfocitos B de bazos normales. Sin embargo, estos autores, además de estudiar la acción sobre los tumores antes mencionados, también ensayaron otros tumores murinos tales como linfomas T, mielomas, etc, y algunos otros tumores de origen humano (linfomas de células B) todos ellos resultaron resistentes a la acción anti-tumoral de los LPS.

Según parece la molécula del LPS, es capaz de inhibir la incorporación de precursores del DNA, siendo el componente activo el lípido A. RALPH (1973) también han observado la acción inhibitoria de la fitohemaglutina (mitogeno de células T) sobre

linfomas de células T. Estos autores sugieren que las células tumorales -en continua división- pueden llegar a diferenciarse mediante la señal mitogénica en células tipo terminal, incapaces de dividirse.

6. Interacciones endotoxina-virus

Un mecanismo de defensa frente a la infección viral es la producción de interferón por las células del animal huésped. Según han demostrado HO (1964) y POSTIC y cols. (1967), la elaboración de estas sustancias ocurre también después de una inyección de endotoxina. Estos interferones, inducidos por endotoxina, difieren algo de aquellos inducidos por virus, aunque sean capaces de inhibir la síntesis viral de igual manera. Ello puede ser la causa de la resistencia inducida por la endotoxina a la infección por los virus de la ectromelia (GLEDHILL, 1959), virus influenza (WAGNER y cols. 1959) y de Newcastle (FINKELSTEIN, 1961). Las infecciones virales en las cuales la endotoxina puede inducir resistencia son, por lo general, aquellas que resultan mas sensibles a la acción de interferón. (DAVIS y cols. 1967). En conejos, los títulos de interferón alcanzan rápidamente, después de la inyección de endotoxina, unos niveles bajos (a las 2-4 horas) en comparación con las grandes cantidades que se obtienen con polinucleotidos y permanecen elevados durante más de 7 horas (POSTIC y cols. 1957). El interferón actúa en una etapa temprana de la multiplicación del virus, y en ciertos momentos, puede revertir la inhibición producida por el virus sobre la síntesis de RNA del huésped.

Segun algunos autores (HO y KONG, 1965, YOUNGER y cols. 1965, KE y cols. 1966), el interferon inducido por endotoxina difiere del inducido por virus en que su producción no resulta inhibida por inhibidores de síntesis de RNA mensajero, ni por inhibidores de la síntesis proteica.

Estos resultados sugieren que el interferón inducido por endotoxina, a diferencia del inducido por virus, no requiere síntesis de RNA mensajero, ni de proteínas, esto es, que no se sintetizan por las células sino que tan sólo se produce una liberación del mismo. Se han observado otras diferencias entre ambos sistemas, según que la producción de interferón sea inducido o no por endotoxina; en el primer caso, a diferencia del otro, el interferón es inhibido por cortisol e inducido por adrenalectomía (POSTIC y cols. 1967) y no se inhibe por una reducción de la temperatura del cuerpo, a diferencia de lo que ocurre en el caso del interferon inducido por virus (POSTIC y cols. 1966). Sin embargo en estudios "in vitro", realizados por FILKELSTEIN y cols. (1968), se ha observado que la producción de interferón, por macrófagos estimulados con endotoxina es inhibida por actinomicina D y puromicina, aunque sólo a dosis mas altas que las eficaces para inhibir las células estimuladas por virus. Por otra parte De CLERCQ y MERIGAN (1970), encuentran que la cicloheximida, administrada en ratón después de la inyección del inductor, puede acentuar la producción de interferón independientemente de que se use virus, endotoxina o polinucleotidos.

HO y cols. en 1973, estudiando el mecanismo de inducción de interferón por endotoxina, llegan a la conclusión de que la inducción por polinucleotidos, virus o endotoxina ocurre por un mismo mecanismo. Postulan que estos agentes activan el gen responsable de la producción de interferon, se transcribe el RNA mensajero, que a su vez se traduce -posiblemente- a través de unos productos génicos intermediarios, tales como el preinterferón (HO y cols. 1970). Uno de estos productos

de traducción, bien el interferón o un precursor suyo, activa el gen de la proteína control e inhibe la síntesis de interferón, mediante la inhibición de la actividad del mRNA del interferon después de la transcripción. Estos autores sugieren que el RNA mensajero para esta proteína control o bien la propia proteína control son mas lábiles que el RNA mensajero del interferón o que el interferón mismo. Esto explicaría el hecho de que a una dosis dada de actinomicina, se inhiba preferentemente la proteína control mientras que la producción de interferón continua o se acentua bajo una inhibición parcial de estos antibioticos. Los diferentes pesos moleculares y variabilidad de las características fisicoquímicas de los distintos interferones, pueden deberse a las distintas agregaciones o grados de polimerización de las moléculas básicas de interferon (CARTER, 1970). TYTELL y cols. (1967) tratan de explicar el retraso en la producción de interferon inducido por virus, con respecto al inducido por endotoxinas y por polinucleotidos sintéticos, mediante la posible necesidad de un RNA bicatenario que permita conseguir una buena inducción.

YOUNGNER (1970) obtiene producción de interferon con algunos lipopolisacaridos de bacterias Gram-negativas, aunque en el caso del LPS del genero Brucella no se consigue producir interferón, a no ser que se utilicen bacterias muertas (De SOMER y cols. 1970). También KELETI y cols. (1974) consiguen producir interferón en ratón, mediante una inyección intravenosa de 200 μ g de LPS de B. abortus obteniendo el pico de producción máxima a las 2 horas despues de la inyección. Cuando estos autores trataron a los ratones con cicloheximida, previamente, se produjo una respuesta retardada en la que se alcanzó el pico a las 8 horas y también un incremento de los títulos de interferón en suero.

El LPS de Brucella es un inductor de interferón mucho más débil que el de S. typhimurium (cepa LT-2), ya que éste es activo a dosis de 0,1 μ g/20 gr de peso.

El lípido A del LPS es el responsable de la producción de interferón (YOUNGER y cols. 1973), no obteniéndose inducción de éste con las cadenas antigenicas O. La hidrólisis parcial suave -con ácido- del glicólipido de S. typhimurium (cepa G-30/6-21, quimotipo Re), que elimina el KDO, da lugar a una pérdida de actividad que, seguramente, es debida a una reducción de solubilidad. Ya que el lípido A es el responsable de la producción de interferón, cabe pensar que esta diferencia de actividad puede deberse a diferencias estructurales. entre la parte lipídica del LPS de Brucella y el de Salmonella.

Estos autores son capaces de producir dos tipos distintos y separados de respuesta por interferon; una es retardada (del tipo inducida por virus) y otra es rápida (típica de endotoxina y polinucleotidos).

Otro efecto muy sorprendente del LPS es la inducción de virus del tipo C en cultivos celulares. Este tipo de virus aparece muy frecuentemente en cepas de ratón congénicas AKR, y se puede detectar muy facilmente por ensayos de infectividad. (GROSS, 1966, HARTLEY y cols. 1969). Este virus es capaz de inducir tumores principalmente en células del sistema linfático. En otras estirpes celulares, en apariencia libres de virus, se puede inducir éste de varias formas: "in vivo" por radiación X (KAPLAN, 1967, HARAN-GHERA, 1966), o por

carcinógenos químicos (IGEL y cols. 1969), o mediante reacciones huesped-transplante (HIRSCH y cols. 1972) e "in vitro" por cultivos continuados (AARONSON y cols. 1969), por tratamiento con rayos X (ROWE y cols. 1971), o por análogos halogenados de la pirimidina (LOWY y cols. 1971, AARONSON y cols. 1971) y en cultivos mixtos de linfocitos (HIRSCH y cols. 1972).

MORONI y cols. (1975 a) inducen virus del tipo T en cultivos de corta duración, con células de bazo procedente de ratones BALB/C, mediante una combinación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) y LPS de E. coli (tipo Westphal) o concanavalina A. La fitohemaglutinina a dosis mitogénicas no tiene ningún efecto, tanto si se utiliza sola como combinada con bromo deoxiuridina. Al mes siguiente de este mismo año, MORONI y SCHUMANN (1975 b) publican un trabajo sobre la inducción de virus C en cultivos cortos de células de bazo de BALB/C con lipopolisacárido de E. coli 0111:B4 y de Salmonella abortus equi, detectándolo por microscopía electrónica y caracterizando su actividad transcriptasa inversa. La inducción de virus tipo C endógeno es bastante frecuente "in vivo". AARONSON y STEPHENSON (1974) encontraron que casi todas las cepas de ratón que probaban tenían títulos de anticuerpos muy altos frente a virus endógenos xenotrópicos. Sería muy interesante investigar la relación entre virus inducidos por LPS, virus trópicos endógenos de ratón y virus xenotrópicos y tendría también mucho interés ver si estas moléculas de LPS son capaces de inducir virus en otras especies animales incluida la humana.

7. Cambios metabólicos y endocrinológicos

Durante la endotoxemia se producen alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono. Al comienzo de la intoxicación aparece una hiperglucemia muy marcada, debida a una movilización masiva de glucógeno seguida de una hipoglucemia acusada en las fases terminales del shock endotóxico (SHANDS y cols. 1969). La hiperglucemia se debe en gran parte, según ZWADYK y cols (1973), a la glucogenolisis hepática; sin embargo, cuando las reservas de glucógeno se agotan, la gluco-regulación hepática se centra en la gluconeogenesis. Es probable, que la transición de un estado glucogenolítico, a uno gluconeogénico, sea una etapa crítica y vulnerable para la adaptación del metabolismo del hígado al shock endotóxico.

BERRY (1971) ha establecido claramente que las reservas de carbohidratos se agotan por la administración de endotoxina. Paralelamente, la homeostasis de la glucosa sanguínea se hace dependiente de la gluconeogénesis. Es lógico pensar que, debido a que el sistema nervioso central necesita glucosa para su funcionamiento en situaciones de "stress", un fallo en la gluconeogénesis hepática puede disminuir la resistencia al "stress" y facilitar la inducción de shock. Por lo tanto, un incremento de la gluconeogenesis puede dar lugar a una protección contra la inducción de shock endotóxico. CORNELL y FILKINS (1974), y FILKINS y CORNELL (1974) observan la existencia de un incremento de la gluconeogenesis hepática en ratas con una noche de ayuno, estos autores sugieren que el aumento de resistencia al shock observado en estos animales se debe al incremento de la gluconeogenesis. Esto parece de acuerdo con el incremento de la sensibilidad frente al shock que se

observa al deprimir la gluconeogenesis, por ejemplo con tetracloruro de carbono (FARRAR y WATSON, 1964), sales de plomo (FILKINS, 1973), adrenalectomia (FILKINS, 1972) o infecciones por micobacterias (SHANDS y cols. 1969). Por el contrario, los glucocorticoides que son vitales para obtener una gluconeogenesis máxima, son antagonistas potentes de la endotoxidad (BERRY, 1971).

Por otra parte, el estado de hipoglucemia puede contribuir al aumento de la descompensación circulatoria, que acompaña al shock endotóxico.

No se conoce todavía el mecanismo por el cual la endotoxina altera la gluconeogenesis, aunque se sabe que estas moléculas no muestran ningún efecto sobre los hepatocitos aislados y esto sugiere que debe de existir algún mediador en el proceso. Por distintos datos, hasta ahora conocidos, es posible que puedan estar implicados en el proceso los siguientes mecanismos:

a) defectos del control pancreático de la gluconeogenesis, a través de deficiencias de insulina o de glucagon; b) defectos en la respuesta al control permisivo, por glucocorticoides, de la gluconeogenesis; c) un defecto en la inducción o funcionamiento de las enzimas gluconeogénicas; d) un defecto en la regulación del metabolismo del hepatocito por el AMP cíclico, debido a la propiedad de la endotoxina de bloquear la AMP ciclasa, o finalmente e) una reducción de la función oxidativa mitocondrial. Alguno de estos mecanismos los vamos a tratar a continuación con un poco mas de detalle.

BERRY y colaboradores estudian el efecto de las endotoxinas sobre la inducción de enzimas hepáticos y comprueban que la endotoxina inhibe la inducción por adrenocorticoides de la fosfoenol-piruvico-carboxiquinasa (BERRY y RIPPE, 1973) y de la triptofano-oxigenasa (RIPPEY y BERRY, 1973). Sin embargo la inducción de la tirosin -amino-transferasa no se altera por la endotoxina. Los niveles de fosfoenol-piruvico-quinasa se incrementan durante el ayuno, paralelamente a la gluconeogenesis, mientras que en animales tratados con endotoxina -este incremento- no se observa. A la vista de los resultados que obtienen tanto "in vitro" como "in vivo", estos autores concluyen que la endotoxina interfiere -a través de un mediador- con la síntesis de enzimas inducidas y que son esenciales para mantener la homeostasis.

MELA y cols. (1971), por otra parte, observan que las moléculas de LPS inhiben profundamente el metabolismo oxidativo de las mitocondrias, tanto "in vivo" como "in vitro". También, mas adelante, GREER y cols. (1973) postularon que el LPS actuaba sobre las membranas mitocondriales mediante quelación del Mg^{++} endógeno y pudiendo, de esta forma, alterar la función propia de estas membranas. El LPS, en presencia de Mg^{++} , pierde toxicidad y no altera la fosforilación oxidativa. Ellos sugieren que se necesita una cierta concentración de Mg^{++} para que el LPS tenga el tamaño y la conformación necesaria para ser tóxico; de aquí que el LPS, con EDTA, pierda la integridad de su estructura y su actividad tóxica para las mitocondrias.

SPITZER y cols. (1973) investigan el efecto de una inyección de LPS de E. coli sobre la respuesta lipolítica inducida por nor-epinefrina en células del tejido adiposo de perro y observan que se produce una liberación mayor de ácidos

grasos y de glicerol. SPITZER (1974), para poder esclarecer el mecanismo por el cual la endotoxina altera el metabolismo lipídico de las células adiposas, estudia "in vitro" las interacciones entre endotoxina y células adiposas y sugiere dos posibles mecanismos de acción: a) que la endotoxina altere algún componente lipídico o proteico de la membrana, o de los dos tipos, aumentando de esta forma el número de receptores hormonales en la superficie celular; y, b) que actúe alterando la distribución iónica de la membrana. El LPS incrementa los niveles de AMP cíclico intracelular, probablemente activando indirectamente la AMP ciclasa; por ser un enzima que está asociado a la membrana y es mas accesible que la fosfodiesterasa a la unión de los iones Ca^{++} , que resultan inhibidores de la misma. Esta unión de iones Ca^{++} puede producir alteraciones en las propiedades físicas de la membrana.

Por otra parte, las prostaglandinas, que son moduladores endógenos de la lipólisis inducida por hormonas de células de tejido adiposo, necesitan una membrana celular intacta para desarrollar su acción. Las modificaciones de la membrana plasmática, a las que nos acabamos de referir, pueden alterar su acción específica e impedir la regulación normal con lo que se aumenta la lipólisis.

Recientemente, WOLFF y COOK (1975) estudiando la estimulación de la esteroidogénesis y de la adenilato ciclasa producida por LPS de E. coli, Serratia marcescens y Salmonella typhosa, sobre las células de tumores adrenales, sugieren que estos cambios del metabolismo pueden deberse a alteraciones producidas por el LPS en la conformación de la membrana plasmática,

análogamente a lo que parece suceder con otros estimuladores del adenilato ciclasa tales como hormonas (RUBIN y cols. 1973) y policationes (WOLFF y COOK, 1975).

En el shock endotóxico, también se incrementan los niveles de prostaglandinas en plasma y, NAKANO y PRANCAN (1973), observan que este incremento puede deberse a un efecto en la actividad enzimática de la prostaglandin-dehidrogenasa que inactiva las prostaglandinas, alterandose su metabolismo tanto en riñón como en pulmón.

Y por último, también se ha comprobado que los LPS bacterianos son capaces de estimular "in vitro" la hemo-oxigenasa de los macrofagos peritoneales de rata, encargados de la eritrofagocitosis.

Asimismo, estas endotoxinas pueden afectar "in vivo" a la hemo-oxigenasa de hígado (GEMSA y cols. 1974).

8. Resistencia inespecífica a infecciones

ROWLEY, (1955), observó que animales que habian sido inyectados con paredes de E. coli unas veinticuatro horas antes de la inyección de bacterias, eran mucho menos susceptibles que los demás, a la infección. Desde entonces, diversos autores han visto que una variedad de endotoxinas bacterianas inducen resistencia frente a la infección por algunas bacterias como E. coli, Klebsiellas, Pneumococci, Pseudomonas, Salmonellae y Staphylococci (ROWLEY, 1955, DUBOS y SCHAEDELER, 1956, LANDY, 1956, MARGHERITA y FRIEDMAN, 1965, BERGER y FUKUI, 1963, KIMBALL y cols. 1968) frente a hongos como Candida y Cryptococcus

(WRIGHT y cols. 1969, KIMBALL y cols. 1968, WOLFF, 1968), frente a algunos parásitos del género Plasmodia y Trypanosoma (SINGER y cols. 1964, MacGREGOR y cols. 1969) y frente a virus del tipo Ectromelia, encefalitis y New Castle (WAGNER y cols., 1959, GLEDHILL, 1959, FINKELSTEIN, 1961, WAGNER y cols. 1959).

En estos aspectos CLUFF (1970) ha hecho una revisión sobre los efectos de las endotoxinas en relación con la susceptibilidad a las infecciones, indicando que este incremento de resistencia puede estar relacionado con un aumento de la actividad de los macrófagos y del sistema retículo endotelial, con un cuadro de granulocitosis y con algunos cambios vasculares. Sin embargo, no se conoce el mecanismo de esta resistencia inespecífica a la infección, que aparece después de la administración de endotoxinas. ELIN y WOLFF (1974), estudiando el papel del hierro en la resistencia inespecífica frente a una infección por Candida albicans inducida por la presencia de endotoxina de E. coli, sugieren que los cambios condicionados por endotoxina sobre el metabolismo del hierro resultan ser muy importantes para el desencadenamiento de esta resistencia.

9. Otros efectos

Además de todas las acciones antes citadas, existen otras mas propiamente inmunológicas que serán tratadas con más amplitud en los apartados VI y VII. Entre ellas un incremento de fagocitosis en los leucocitos (CLINE y cols. 1968), blastogénesis en linfocitos (SHANDS y cols. 1973) y mitosis en macrófagos (FORBES, 1965). Asimismo, estos LPS, pueden actuar como adyuvantes, mitógenos, inmunógenos e inmunosupresores.

Para terminar, diremos, que la administración de endotoxina puede dar lugar a trastornos hemorrágicos graves y shock, seguido de la muerte en muchas ocasiones.

WOLFF y BENNET (1974) observan que las septicemias de bacterias Gram-negativas, poseyendo endotoxinas, producen la muerte en un 25% de los enfermos.

Uno de los pocos efectos de las endotoxinas, descrito sobre un sistema procariotico, es el de una de-represión de la nitrogenasa (inhibida por amoniaco) en Azotobacter (LEPO y WYSS, 1974).

VI. INTERACCIONES ENDOTÓXICAS CON EL SISTEMA INMUNITARIO

Los lipopolisacáridos extraídos de bacterias Gram-negativas poseen un amplio espectro de actividades inmunológicas. Así se ha comprobado que las moléculas de LPS pueden actuar como mitógenos para los linfocitos B (ANDERSSON y cols. 1972, GERY y cols. 1972); también son coadyuvantes muy activos, en algunas ocasiones, mientras que en otras pueden funcionar como inmunosupresores (NETER, 1969) o dar origen a una tolerancia inmunológica específica; asimismo resultan ser buenos inmunógenos, ya que en pequeñas dosis pueden dar lugar a una buena respuesta de anticuerpos "in vivo" (RUDBACH, 1971). En los siguientes apartados vamos a tratar cada uno de estos efectos y actividades por separado.

1. Actividad inmunogénica

Las moléculas de LPS son antígenos que, al inyectarlos en animales, dan lugar a la formación de anticuerpos específicos. MÖLLER y cols. (1973) han comprobado que estos anticuerpos son, por lo general, del tipo Ig M, ya que en algunos casos no se produce síntesis de IgG. La síntesis de anticuerpos IgM se regula por un mecanismo de retroalimentación, en el cual los anticuerpos suprimen su propia síntesis al combinarse con el anti-

geno. No se conoce la razón por la cual, en algunos casos, tiene lugar la formación de anticuerpos IgG mientras en otros no.

Según es sabido, la inducción de síntesis de anticuerpos requiere, por lo general, un reconocimiento -por parte de las células inmunocompetentes- de dos determinantes del inmunógeno: el primero de ellos, es reconocido por un receptor en el precursor de las células formadoras de anticuerpos, en tanto que el segundo lo efectúa el sistema de cooperación celular. El reconocimiento de estos dos determinantes, por diferentes poblaciones celulares, da lugar a la formación de un estímulo inductor para los precursores de las células formadoras de anticuerpos. Existen tres modelos básicos para explicar la activación de los linfocitos B:

a) En uno de ellos -el de señal única- se considera que las células cooperadoras constituyen un mecanismo de presentación, de los determinantes antigénicos, a las células precursoras en una determinada densidad (FELDMAN, 1972). Así, las células B se disparan por medio del entrecruzamiento de los receptores existentes sobre las propias células B; bien sea por un antígeno polimérico o por las moléculas antigénicas, (que existen distribuidas sobre la superficie de los macrófagos) a través de receptores específicos de las células T.

b) Otro modelo propone, que para que tenga lugar la activación de células B se necesita una señal mitogénica inespecífica. Los receptores del antígeno interpretan un papel pasivo, ya que se limitan a poner en contacto los precursores de las células formadoras de anticuerpos con el sistema de cooperación celular; con ello dan lugar a la liberación de un estímulo

mitogénico (COUTINHO y MÖLLER, 1973)

c) Finalmente, en los modelos de dos señales, se requiere que la interacción del antígeno con el receptor-que existe en el precursor (sobre las células formadoras de anticuerpos)- mande una señal a estas células y que a su vez, las células cooperadoras, liberen una segunda señal para completar el estímulo inductor (WATSON y cols. 1973). Esta segunda señal es un factor soluble no específico liberado por las células T (SCHIMPL y WECKER, 1972) y quizá también por los macrófagos (SCHRADER, 1973). Así, en los dos últimos modelos, los receptores inmunoglobulínicos tienen un papel pasivo para la fijación del antígeno; y con ello, se desencadenará la reacción inmunitaria, ya sea por mediación de la señal mitogénica intrínseca de los antígenos T independientes, o bien por los factores solubles liberados a partir de las células cooperadoras o accesorias a través de un puente antigénico (ANDERSSON y cols. 1972). La diferencia principal, entre estos dos modelos, es si la causa desencadenante para la estimulación de antígenos T-independientes es por entrecruzamiento de receptores, (después de la interacción con el antígeno) o depende de una fase mitogénica.

Por otra parte, el LPS y otros antígenos T-independientes (flagelina polimerizada, polisacárido de *Pneumococco* etc), debido a su señal mitogénica intrínseca, pueden sustituir los factores T y son capaces de inducir la respuesta inmune primaria frente a antígenos T-dependientes en ausencia de células T (SCHRADER, 1974).

El LPS es un potente inmunógeno en casi todas las cepas de ratón; sin embargo, en algunas -como por ejemplo la C3H/HeJ- tiene una respuesta muy pobre (SULTZER, 1972). Esta respuesta esta bajo control genético y en ella parecen estar implicados varios genes; los linfocitos de estas cepas tampoco se activan mitogénicamente con el LPS.

REED y cols. (1973) estudian la respuesta frente a LPS de E. coli en ratones normales, en ratones atímicos congénicos (ratones desnudos) y en ratones fenotípicamente normales, compañeros de camada de los atímicos, y observan que los ratones atímicos responden de forma similar a los normales. Con esto parece demostrarse la timo-independencia de la respuesta a LPS en ratones sin timo funcional. Asimismo, la respuesta secundaria frente a estos antígenos (en ratones de este tipo) llega a producirse -casi seguramente- porque las células que llevan la memoria inmunológica no son tímicas. Sugieren que la timo dependencia no se debe a la naturaleza de los grupos inmunodeterminantes del antígeno, sino a su forma física y a su presentación. FELDMAN y BASTEN (1971) han visto en el caso de la flagelina, que según esté en forma polimerizada o monomérica induce una respuesta timo-independiente o timo-dependiente respectivamente.

NETER y cols. (1973) estudian los efectos de la temperatura sobre la inmunogenicidad y antigenicidad de las moléculas de LPS. Así comprueban que al calentar el LPS, se reduce su inmunogenicidad en un 95%, produciéndose muy pocos anticuerpos; sin embargo el animal queda inmunizado primariamente y tiene lugar una inmunización secundaria cuando se administra una inyección de recuerdo con antígeno no calentado. Congelan-

do y descongelando varias veces la preparación de antígeno, se logra restaurar otra vez su inmunogenicidad; sin embargo, la antigenicidad es decir, la capacidad de un antígeno para neutralizar los anticuerpos anti-O, no se modifica con estos tratamientos. Estos autores sugieren que los cambios en la capacidad inmunogénica pueden deberse a mecanismos de asociación y disociación, o bien a cambios en la configuración del portador de los determinantes antigénicos.

Los LPS son capaces de transformar en inmunogénico un hapteno monovalente que no sea inmunogénico "per se", (es demasiado pequeño para interaccionar simultáneamente con dos poblaciones celulares) (WATSON y cols. 1973). El hapteno al interaccionar con su receptor manda una señal a las células precursoras, mientras que el LPS incrementa la eficiencia de la señal enviada por el sistema de cooperación celular. TRENNER (1974) utiliza células T activadas frente a aloantígenos de las células precursoras, para producir anticuerpos "in vitro" frente a los haptenos del di-ó trinitrofenol (DNP, TNP) y frente a glicerolfosforilcolina (GPC).

Se originan diferencias interesantes en la respuesta inmune frente a un hapteno, según se utilice para completar el estímulo inductor el LPS o células T activadas frente a aloantígenos. El LPS estimula en ausencia de antígeno una inmuno respuesta de fondo bastante considerable, mientras que las células T activadas por aloantígenos, no son capaces de hacerlo. El número total de células formadoras de anticuerpos es mayor en cultivos estimulados con LPS y antígeno, que en los cultivos estimulados por células T-activadas. Las células de bazo de animales atímicos congénitos en presencia de LPS o de células T-acti-

vadas incrementan su capacidad de síntesis de DNA; sin embargo, el tanto por ciento de células que sintetizan DNA es mayor en el caso del LPS. Este autor sugiere que la primera señal se induce por la interacción del antígeno con el receptor y la segunda por el reconocimiento, efectuado por las células T, de los antígenos de membrana existentes en los precursores de células formadoras de anticuerpos.

JACOBS y MORRISON (1975) estudian el mecanismo de la respuesta primaria "in vitro" de células de bazo murinas, frente a TNP conjugado con LPS como portador. el TNP se une covalentemente al polisacárido central y al lípido A, haciéndolo en una proporción aproximada de 2, 4 moléculas de hapteno por molécula monomérica de LPS. Este complejo TNP-LPS formado es inmunogénico "in vitro" a muy baja concentración y es capaz, como ya hemos visto, de originar una respuesta de anticuerpos anti-TNP que sean T-independientes. Esta estimulación a bajas dosis sugiere, según estos autores, que el antígeno se une preferentemente a células B con receptores de alta afinidad para el hapteno y, seguidamente, el LPS estimula estas células a dividirse y diferenciarse. En este caso, el TNP, sirve al menos para concentrar la señal del LPS sobre los precursores anti-TNP. La señal del LPS es seguramente mitogénica ya que el TNP conjugado con LPS que ha sido sometido previamente a hidrólisis alcalina suave (hidrólisis de los enlaces ester o amida de los ácidos grasos del lípido A), no inducen una respuesta "in vitro" anti-TNP. Con este tratamiento las cadenas antigénicas O del LPS no se alteran y ello parece indicar, por tanto, que se necesita un lípido A intacto. Cuando intervienen el LPS sólo, se estimulan la mayoría de las células B (respuesta policlonal), produciéndose anticuerpos frente a muchos antígenos, entre ellos el NNP, el TNP y otros; mientras que el NNP-LPS y el TNP-LPS

estimulan preferentemente la producción de anticuerpos de alta afinidad.

El máximo número de células formadoras de anticuerpos anti-NNP se produce a una concentración mas baja con el complejo NNP-LPS que cuando se utiliza el LPS sólo. Estos autores concluyen finalmente que, aunque sus resultados son bastante compatibles con el modelo en el cual la mitogenicidad del portador tiene un papel muy importante para inducir una respuesta T-independiente, no es seguro todavía que la señal mitogénica sea siempre una señal inespecífica para estimular la respuesta en IgM. Sugieren que alguna otra propiedad del LPS, por ejemplo la de activar el C3 (DUKOR y cols. 1974), podría ser la responsable de la estimulación de los linfocitos.

Por otra parte, CHEDID (1973) observa que algunos ratones se hacen hiperreactivos frente a endotoxinas, tanto después de una inmunosupresión como de inmunoestimulación y ello parece indicar que la susceptibilidad de una endotoxina puede incrementarse por un desequilibrio inmunológico.

BLANKWATER y cols. (1975) estudian la respuesta frente a derivados alquilados de LPS de E. coli en ratones negros de Nueva Zelanda y observan que el título de anticuerpos disminuye con la edad, llegando incluso a desaparecer en algunos casos. Concluyen que esto puede deberse a un efecto a nivel de células B, del mismo modo que otros antígenos afectan a las células T.

El LPS detoxificado con un álcali pierde las actividades biológicas asociadas con el lípido A. En este caso en

lugar de producir dos señales inmunológicas, dá lugar tan solo a la señal específica antigénica (polisacárido O), pero carece de la señal inespecífica de carácter mitogénico. En estas condiciones no es capaz de actuar como mitógeno, según hemos visto antes, ni como adyuvante de antígenos proteicos (SKIDMORE, 1975).

VON ESCHEN y RUDBACH (1976) estudian la respuesta "in vivo" frente a LPS en ratón. Estos autores comprueban que el LPS detoxificado con álcali produce varias reacciones: a) origina una respuesta primaria en ratones normales y atímicos, b) no estimula respuestas secundarias, en ocasiones, ni en ratones atímicos; c) aunque no estimula para respuestas secundarias, puede sensibilizar los ratones atímicos para una respuesta secundaria que se puede estimular con una inyección de LPS. La respuesta primaria obtenida en estas condiciones tiene una cinética similar a la respuesta frente a un polisacárido nativo protoplásmico y no mitogénico. Desde el punto de vista funcional el LPS tratado con álcali posee solamente la señal antigénica; esto confirma el concepto de la separación funcional de las dos señales inmunológicas requeridas para estimular una respuesta secundaria de anticuerpos. El hecho de que el LPS detoxificado, no siendo mitogénico, estimule la respuesta en anticuerpos de ratones atímicos congénicos, está en contra de la hipótesis de COUTINHO y MÖLLER (1975) de que los antígenos T-independientes son inmunogénicos debido a ser activadores policlonales de las células B. El que el LPS detoxificado sensibilice a los ratones atímicos congénicos y no a los normales, frente a una respuesta secundaria con el LPS, puede significar que las células T ejercen una acción supresora sobre la capacidad del LPS detoxificado para inducir un estado de memoria inmunológica en ratones normales.

Esta acción se ha podido observar con otros antígenos T-independientes tales como el polisacárido de pneumococo tipo III y la polivinil-pirrolidona (BAKER y cols. 1970, ROTTER y TRAININ, 1974). La desaparición de la señal mitogénica inespecífica, por el tratamiento alcalino del LPS, hace que se manifieste la actividad supresora de las células T; la cual, no es capaz de manifestarse con LPS unicamente. Todo ello les lleva a concluir que la molécula del LPS y la del LPS detoxificado tienen propiedades inmunológicas bastante diferentes y ello hace que se dude de algunos experimentos realizados por el grupo de MÖLLER (MÖLLER y SJÖBERG, 1972), en los que se ha utilizado el LPS detoxificado para producir tolerancia inmunológica.

2. Efecto inmuno-coadyuvante de las endotoxinas

La respuesta humoral frente a un antígeno se puede potenciar por la adición de un estímulo inespecífico o coadyuvante. Estos coadyuvantes pueden actuar en diferentes etapas de la respuesta inmune. Así, DRESSER (1970) ha sugerido que la actividad coadyuvante actúa estimulando la división celular y que las células afectadas pueden ser, tanto las células precursoras (sin un cometido determinado) como las células con una función inmunitaria ya definida y prefijada; o incluso, aquellas células que aún estando ya en contacto con el antígeno, puede modificarse la naturaleza de su cometido. Una célula sensible a antígeno necesita dos estímulos para iniciar su diferenciación hacia una célula formadora de anticuerpos; es decir un estímulo antigénico específico y un estímulo inespecífico (coadyuvante) que es el que inicia la división celular. La combinación de estos dos estímulos da lugar a una población de células formadoras de anticuerpos, mientras que un estímulo específico, por sí solo,

puede dar lugar a un efecto contrario, es decir, a la inducción de un estado específico de tolerancia inmunológica por producir la inactivación de las células correspondientes (DRESSER, 1970) El segundo estímulo inductor se puede originar por alguna propiedad no específica, propia del antígeno, o por la administración -simultáneamente con el antígeno- de un coadyuvante.

La acción coadyuvante puede centrarse a nivel de distintos tipos celulares. DRESSER (1972) ha observado que las propiedades coadyuvantes de la Bordetella pertussis, sobre la respuesta inmune a globulos rojos de carnero (SRBC) en ratón, se produce a nivel de las células B y T: a bajas dosis de antígeno se favorece la acción de la Bordetella pertussis sobre las células T, mientras que a dosis mas altas el efecto se manifiesta sobre las células B. UNANUE y cols. (1969) han sugerido que la Bordetella pertussis puede ejercer, parte de su efecto coadyuvante, a través de la estimulación de macrofagos; y ALLISON y DAVIES (1971), han demostrado que este efecto coadyuvante -tanto el de la bacteria (Bordetella pertussis) como el de los LPS- parece estar mediado a través de macrófagos que, a su vez, incrementan la capacidad cooperadora de las células T.

Mas adelante, GERY y WAKSMAN (1972) han encontrado que los macrófagos tratados con endotoxina liberan un factor soluble que estimula los linfocitos T.

CLUFF (1970) observó que los LPS daban lugar a un aumento de la actividad fagocitaria del sistema reticulo endotelial, aunque NAKANO y cols. (1973) afirman que este incremento de actividad fagocitaria de los macrófagos no tiene una relación grande con su efecto coadyuvante, ya que cuando tratan con

LPS "in vitro" una población de linfocitos y la transfieren a ratones singénicos, la respuesta de éstos frente a SRBC (*) aumenta notablemente; esto no sucede, sin embargo, en el caso de macrófagos.

Estos autores concluyen que el efecto coadyuvante del LPS sobre la respuesta a SRBC se ejerce a través de las células T y B.

Estos últimos resultados no están de acuerdo con los de ALLISON y DAVIES (1971), expuestos anteriormente; quizá se deba esta discrepancia a que NAKANO y cols utilizan un inmunógeno muy fuerte (SRBC), mientras que los otros autores ensayan con uno débil, como es la seroalbumina bovina (BSA). En el caso del BSA, la tolerancia e inmunización pueden ocurrir simultánea y competitivamente; y de este modo, el antígeno, asociado con macrófagos, es capaz de inducir la respuesta del huésped hacia la inmunización.

En cuanto a la síntesis de inmunoglobulinas, DRESSER y PHILIPS (1974), han observado que el LPS de E.coli ejerce su acción coadyuvante directamente sobre las células B y que la respuesta en IgM -frente a SRBC en ratón- resulta parcialmente independiente de células T, mientras que la de IgG está muy condicionada a la presencia de células T. De esta manera, se puede predecir que un coadyuvante de células B afecta predominantemente la respuesta en IgM, mientras que un coadyuvante de células T potencia la respuesta en IgG más que la de IgM. Según estos autores, el LPS hervido, es peor coadyuvante que cuando se emplea suspendido en solución salina, por homogeneización o sonicación.

(*) SRBC = suspensión de glóbulos rojos de carnero

El LPS también puede actuar en ausencia de células T, pero la respuesta absoluta es mayor cuando existen estas células T. Concluyen por lo tanto que el LPS ejerce su acción coadyuvante, directamente sobre las células B, pudiendo sustituir algunas de las funciones de las células T, pero no todas.

ARMERDING y KATZ (1974) sugieren que el LPS induce "in vitro" una respuesta policlonal (antígeno-independiente) en un número limitado de linfocitos B, pero que el efecto adyuvante del LPS, sobre las respuestas anti-antígeno "in vitro" e "in vivo" son siempre T-dependientes. El efecto del LPS sobre las células T, puede ser directo o bien, estar mediado por un macrófago y por los factores biológicamente activos.

NEWBURGER y cols. (1974) estudian los efectos del LPS sobre la respuesta en anticuerpos IgG e IgE frente a dinitrofenil-proteínas en un sistema de transferencia de células adoptivas ("Adoptive cell transfers") en ratón y comprueban que, cuando inyectan LPS junto con la inyección de antígeno en animales irradiados y reconstituidos con células de bazo de animales inmunizados con este mismo antígeno, se obtiene un aumento en ambos tipos de anticuerpos frente al antígeno original; así demuestran que el mecanismo que controla la producción de anticuerpos IgE e IgG esta sujeto a la influencia coadyuvante del LPS y que la respuesta en anticuerpos IgE es la más susceptible al efecto coadyuvante de bajas dosis de LPS. En este caso, el efecto coadyuvante se ejerce sobre las células T, ya que la función cooperadora específica de la proteína portadora se incrementa con la administración de LPS al mismo tiempo que la inmunización con la proteína portadora. Sus resultados están de acuerdo

con los de ARMERDING y cols. (1974) y los de KAGNOFF y cols. (1974), ya que todos ellos tienen pruebas de que el efecto coadyuvante del LPS depende de células T.

LAGRANGE y cols. (1975 a) observan que cuando el LPS se administra antes que el antígeno (eritrocitos de carnero), se deprime la actividad de las células T (disminuye la hipersensibilidad retardada), mientras que la producción de anticuerpos se aumenta. Esta acción se revierte con un tratamiento a base de ciclofosfamida, que interfiere con la producción de anticuerpos. Las células T-activadas pueden dejar de funcionar en la sangre como mediadoras de la hipersensibilidad retardada, aunque puedan seguir funcionando normalmente como células cooperadoras en el bazo.

El LPS puede inducir inhibición de la respuesta de las células T (deprimiendo la hipersensibilidad retardada) cuando aumenta mucho la producción de anticuerpos por las células B. Estos autores concluyen que el LPS actúa interfiriendo con la inducción de la inmunidad celular, pero no con su expresión.

El LPS puede, por tanto, utilizarse para evitar el rechazo de trasplantes, ya que incrementa la formación de anticuerpos, disminuyendo a su vez la inducción de inmunidad celular. Sin embargo si se administra el LPS después de la inyección de antígeno la inmunidad celular se aumenta.

Más adelante, LAGRANGE y MACKANESS (1975 b) observan otros dos efectos del LPS. Uno de ellos es la supresión aguda,

pero transitoria, de la hipersensibilidad retardada; esto se observa muy claramente cuando el LPS se administra a ratones inmunizados adoptivamente en el momento de la transferencia celular. El otro efecto es un aumento de los niveles de hipersensibilidad retardada que ocurre cuando el LPS se administra de 2 a 6 días después de la estimulación antigénica. La hipersensibilidad retardada se produce por una inmunización subcutánea o intravenosa de ratones con glóbulos rojos de carnero (SRBC) y está mediada por células T, en cooperación con células accesorias (monocitos). Estos autores encuentran efectos diferentes del LPS bacteriano en distintas etapas de la respuesta inmune: a) El LPS puede incrementar la actividad de las células T al administrarlo de 1 a 3 días después de la sensibilización; pero este incremento no ocurre, si el LPS no se deposita en una zona que afecte con su riego sanguíneo a los nodulos linfáticos correspondientes. El efecto estimulante, en este caso observado, es dependiente de la dosis.

b) En animales inyectados con una dosis de eritrocitos de carnero capaz de bloquear las células T, se origina un efecto similar sobre la respuesta a esta inmunización intravenosa, dando lugar a una reacción de hipersensibilidad retardada transitoria.

c) La reacción de hipersensibilidad retardada puede suprimirse con LPS cuando se administra en el momento en que tiene lugar la respuesta de las células T (es decir en el día 4). Este efecto, que es transitorio y reversible, se debe a la acción del LPS sobre las células accesorias, que son necesarias para la expresión de la hipersensibilidad retardada.

Todos estos resultados sugieren una serie de posibles modos de acción del LPS sobre la inmunidad celular y aunque todavía no hay nada suficientemente claro, podemos decir que:

a) El LPS puede proveer de un segundo estímulo a las células que están bajo la influencia mitogénica del antígeno.

b) La actividad de las células T se incrementa por LPS sólo durante la fase proliferativa de la respuesta inmune.

c) El LPS puede inhibir específicamente la producción de anticuerpos implicados en el mecanismo de inhibición por retroalimentación y, en este sentido, DRESSER (1973) ha descrito un efecto análogo al ocasionado por Bordetella pertussis.

d) Cuando se administra la Bordetella pertussis, después de la estimulación antigénica, este efecto coadyuvante aumenta la formación de IgG, mientras que si se dá antes del antígeno se produce una estimulación de IgM.

Esto está de acuerdo con que la producción en IgM se aumenta, aparentemente, al inyectar LPS y los inmuno-complejos formados con IgM pueden bloquear a los mediadores específicos de la hipersensibilidad retardada.

Los resultados de estos autores indican que el LPS, dado en un determinado momento de la respuesta inmune frente a eritrocitos de carnero, puede ocasionar un incremento del nivel y de la duración de la hipersensibilidad retardada.

Finalmente, otros autores, también han observado un aumento del rechazo de transplantes y de tumores en presencia de LPS debido probablemente al efecto activador del LPS sobre las células T.

3 . Interacciones endotoxina-sistema complemento

El complemento es un sistema multimolecular, que sirve de mediador humoral primario en algunas reacciones antígeno-anticuerpo. La activación del complemento puede tener dos consecuencias biológicas distintas: (a) alteraciones funcionales y estructurales de las membranas biológicas seguida de la consiguiente muerte celular y (b) activación de funciones celulares específicas. Esta activación se realiza por los productos de reacción del complemento.

El sistema complemento se puede subdividir en 2 rutas, cada una de las cuales comprende diversas unidades funcionales. La primera de ellas o ruta clásica se activa por complejos del tipo IgG e IgM. Consta de 11 proteínas, que se agrupan en tres unidades funcionales: la unidad de reconocimiento formada por C1q, C1r y C1s que son pro-enzimas, la unidad de activación C2, C3, C4 y el sistema de agresión a la membrana, C5, C6, C7, C8 y C9 (MÜLLER-EBERHARD, 1972). La ruta alternativa, o del sistema properdina (PILLEMER, 1954), se activa por agregados de IgA y de polisacáridos o lipopolisacáridos bacterianos (MÜLLER EBERHARD, 1971). Está compuesto por al menos 5 proteínas del suero, una de las cuales es el factor C3. Esta ruta no utiliza el C1, C2 y C4 y actúa sobre el factor C5-9 de manera análoga al mecanismo de activación clásico.

Además de estas 15 proteínas, el sistema complemento incluye tres reguladores, un inhibidor enzimático y dos enzimas inactivadoras, de tal forma que el sistema completo está compuesto por 18 proteínas o factores séricos.

En los últimos años se han caracterizado once proteínas de la ruta clásica, conociéndose su estructura y parámetros fisicoquímicos.

El C1q es una glicoproteína del tipo del colágeno; reconoce los complejos inmunes y por lo tanto inicia la reacción del complemento, tiene 6 centros de unión de IgG por molécula de C1q. El C2 es una de las dos moléculas precursoras de la enzima C3 convertasa, que contiene dos grupos sulfhidrilo y que al oxidarse incrementan su actividad hemolítica.

El C3 (cadenas α, β), C4 (α, β y γ) y C5 (α, β) son substratos de 3 enzimas diferentes del complemento -las convertasas C3 y C5 y el factor C1s, que es la forma activada del C1s-. En su funcionamiento, primeramente tiene lugar un ataque enzimático que rompe tan sólo un enlace peptídico de la cadena α de cada uno de ellos, dando lugar a fragmentos C3b, C4b y C5b. Estos factores tienen centros activos transitorios, a través de los cuales se pueden unir a aceptores adecuados. Los fragmentos C3b y C4b, unidos a estos aceptores, tienen otro centro de unión estable, que reacciona con el receptor de inmunoadherencia en la superficie de una serie de células de mamíferos. Esta reacción facilita la fagocitosis, por leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrofagos, de partículas unidas al complemento (GIGLI y NELSON, 1968).

El C3b, C4b y, probablemente, el C5b sufren un nuevo ataque enzimático secundario de las cadenas α . Este ataque se realiza por las enzimas inactivadoras de los fragmentos C3b y C4b, rompiendo, estos fragmentos b, para dar origen a las subunidades c y d, de tal forma que el C3d se siga manteniendo

unido a la célula (RUDDY y AUSTEN, 1971).

La dinámica molecular entre las diferentes proteínas, constituyentes del sistema, consta de cuatro fases:

a) interacciones reversibles entre las proteínas de un mismo grupo funcional;

b) una vez activado el complemento por células recubiertas de anticuerpo tiene lugar un proceso de "autoensamblado" en el curso del cual el grupo total de moléculas se transfiere de la solución a la fase sólida de la célula vulnerable. En este caso las 11 proteínas son solubles en solución acuosa y en la transferencia intervienen 3 mecanismos diferentes, interacciones iónicas reversibles (C1), activación enzimática de los centros de unión a la membrana (C2, C3, C4 y C5) y una definitiva adsorción a ésta (C6, C7, C8, y C9); y

c) unión de enzimas complejos, como las convertasas C3 y C5.

d) Finalmente, se originan los péptidos C2b, C4a, C3a y C5a a partir de una proteólisis de las proteínas C2, C3, C4 y C5; las cuales, no participan directamente en la formación de unidades funcionales multimoleculares de la reacción citolítica. No se tienen datos seguros de la actividad biológica de los péptidos C2b y C4a, mientras que el C3a y C5a son las conocidas como anafilatoxinas, de actividad biológica muy acusada (MERGENHAGEN y cols. 1969, ZIMMERMAN y MÜLLER-EBERHARD, 1971).

El C3a y C5a tienen actividades biológicas casi idénticas, originando liberación de histamina de las células cebadas, migración quimiotáctica de leucocitos polimorfonucleares y contracción del músculo liso. Cuando se inyectan en la

piel dan lugar a una formación de edema inmediato y a un eritema. Asimismo son capaces de activar la proesterasa de leucocitos polimorfonucleares; y esta activación enzimática, según parece, es necesaria para la quimiotaxis causada por estos dos péptidos (BECKER, 1972). Mas recientemente, JOHNSON y cols. (1975) observan que la incorporación de C3a marcado por las células cebadas se correlaciona bien con la liberación de histamina.

La reacción citolítica clásica del complemento aparece resumida en la cuadro III (MÜLLER-EBERHARD, 1975). Este modelo esta basado en las siguientes observaciones experimentales. La unión de C1 y las células es dependiente del anticuerpo; el C4 puede unirse a la célula en ausencia de anticuerpo y de C1, siempre que el C1s esté presente en la fase acuosa (MÜLLER-EBERHARD y LEPOW, 1965); más tarde, este factor, también puede unirse al C2 y después al C3 en ausencia del C1s; la unión de C5q a una célula puede estar catalizada por un C4,2,3 localizado en la superficie de otra célula; las células, que poseen C5q sufren una lisis que es independiente de que tenga o no componentes en su superficie y parece ser que el C8, es la molécula encargada de esta citolisis.

En el año 1954, PILLEMER y cols. sugieren que existe una via diferente para la activación del complemento. Describen un sistema en el que no interviene el C1, C2 y C4, comenzando la secuencia del complemento a nivel del C3; este sistema no necesita anticuerpos específicos, teniendo lugar una reacción directa entre el antígeno y una proteína sérica llamada properdina. Mas adelante, PILLEMER y cols. (1955) sugirieron que la endotoxina era capaz de activar este sistema properdina.

CUADRO III.- Reacción citolítica clásica del complemento: unidades funcionales y lugares de acción en la membrana.

Fases	Secuencias moleculares	Esquema final
Activación de la unidad de reconocimiento	$S_1 \begin{array}{c} A + C1q \\ \swarrow \quad \searrow \\ \bar{r} \quad \bar{s} \end{array} \rightarrow S_1A - C1q \begin{array}{c} \bar{r} \\ \downarrow \\ \bar{s} \end{array}$	
Ensamblaje de la unidad de activación	$C4 \xrightarrow{S_1AC\bar{1}} C4a + C4b^*$ $C4 \xrightarrow{S_1AC\bar{1}} C2a^* + C2b$ $S_{II} + C4b^* + C2a^* \rightarrow S_{II}C4b,2a$ $C3 \xrightarrow{S_{II}C4b,2a} C3a + C3b^*$ $S_{II}C4b,2a + C3b^* \rightarrow S_{II}C4b,2a,3b$	
Ensamblaje del mecanismo de ataque a la membrana	$C5 \xrightarrow{S_{II}C4b,2a,3b} C5a + C5b^*$ $S_{III} + C5b^* + C6 + C7 + C8 + C9 \rightarrow S_{III}C5b, 6,7,8,9$	

Símbolos: S_I, S_{II}, S_{III}, lugares distintos topográficamente sobre la superficie celular de la célula vulnerable; A, anticuerpo frente a componente de membrana; La barra significa enzima activa, el asterisco significa centro de unión enzimática activado.

Posteriormente, otros autores como GEWURZ y cols. (1968), en apoyo de este concepto, demostraron que los niveles en suero de C3 a C9 -después de incubar con endotoxina- disminuyen muy marcadamente, mientras que los niveles de C1, C4 y C2 estan cerca de la normalidad; ésto no se corresponde con el consumo de complemento, después de la incubación del suero con complejos de antígeno-anticuerpo, ya que en este caso los niveles de C1, C4 y C2 son los mas afectados.

FRANK y cols. (1971), observan que sueros de cobayas deficientes genéticamente en C4, es decir que son incapaces de realizar la activación del complemento por la via clásica, pueden consumir distintos factores del complemento (del C3 al C9) cuando se efectua la reacción en presencia de endotoxina. Estos autores concluyen que debe de haber, por tanto, una via alternativa para la activación del complemento, y que la endotoxina es capaz de activar dicho mecanismo. GOTZE y MÜLLER-EBERHARD (1971) definen un poco mas ampliamente esta via alternativa y en trabajos posteriores establecen que éste es el sistema properdina descrito por PILLEMER.

Sin embargo, algunos trabajos han apuntado que se necesitan componentes de la via clásica para las interacciones endotoxina-complemento. SNYDERMAN y cols. (1971), en sueros de cobaya sin C4, demuestran el consumo de los componentes terminales del complemento así como la generación de factores quimiotacticos por endotoxina, en sueros de cobaya; mientras que PHILLIPS y cols. (1972) comprueban que se necesita una γ -globulina, C1, C4 y C2 para que sea posible la interacción de eritrocitos de carnero -recubiertos por endotoxina- con suero de

cobaya. Cuando el suero quelado con EDTA (para que no funcione la vía clásica) se hace reaccionar con bacterias intactas productoras de endotoxina, se obtienen datos conflictivos o de difícil interpretación: Así, estirpes de E. coli parecen activar la vía alternativa (FINE y cols. 1972), mientras que el Haemophilus influenzae actúa sobre la vía clásica solamente (FINE y cols. 1973). Por su parte FINE (1974), presenta pruebas en favor de que la endotoxina es capaz de activar tanto la vía clásica como la alternativa del complemento de cobaya, mientras que los eritrocitos recubiertos por LPS sólo activan la vía clásica. Esta reacción es dependiente de un factor sérico absorbible por E-LPS a 0° C. Este factor parece ser un anticuerpo frente a LPS, que no es cepa-específico.

Estos últimos resultados están de acuerdo con los de FRANK y cols. (1973), quienes también encuentran que la endotoxina es capaz de activar ambas vías. MERGENHAGEN y cols. (1973) sugieren que la vía alternativa puede tener más importancia para la generación de factores que inician la respuesta inflamatoria y la coagulación de la sangre. La vía mediada por anticuerpos, sin embargo, puede tener más importancia para producir el daño a la membrana celular

Recientemente SNYDERMAN y PIRE, (1975) observan que la eliminación del Ca^{++} sérico por un quelante muy fuerte (ácido etilen-glicol-bis (β -aminoetil-eter)-N,N'-tetraacético) origina una disminución del consumo de los componentes terminales del complemento, mientras que en el suero normal -en presencia de polisacáridos complejos y LPS- funcionan ambas vías dando lugar a un consumo mayor de estos componentes terminales.

La activación de la vía alternativa del complemento, por la endotoxina, puede dar lugar a la producción de cantidades normales de factores quimiotácticos. A través de esta vía se realiza también la opsonización de bacterias, aunque ésta sea algo mas lenta que en el caso de la vía clásica (FRANK y cols. (1973)).

Como resumen en el cuadro IV presentamos las actividades biológicas que se originan "in vitro", como consecuencia de las interacciones entre endotoxina y complemento (MERGENHAGEN y cols. (1973)).

Por otra parte, también se ha observado que después de la administración de endotoxina hay una disminución del número de plaquetas seguida de un estado de hipercoagulabilidad. FRANK y cols. (1973) concluyen que la inyección de endotoxina en animales normales y carentes del factor C4 demuestra que la activación -por la vía clásica- es necesaria para que tengan lugar la trombocitopenia y para la inducción de un estado de hipercoagulabilidad. Sugieren, estos autores, que cuando la endotoxina se inyecta por vía intravenosa, una parte de la misma se une a las plaquetas de tal forma que: 1) esta asociación forma un complejo biológico equivalente a un antígeno asociado a la membrana; y 2) que el daño a estas membranas se produce por la participación de anticuerpos naturales y por la acción secuencial de los factores C1, C4 y C2, no efectuándose nunca por la vía alternativa

CUADRO IV .- Actividades biológicas, originadas "in vitro",
como consecuencia de las interacciones endotoxina-complemento.

Actividad biológica	Componentes del complemento implicados
Anafilatoxina	C3a, C5a
Contracción del musculo liso	
Mayor permeabilidad capilar	
Liberación de histamina y heparina de las células cebadas	C3a y C5a
Adherencia y degranulación de plaquetas	C3a
Coagulación de la sangre	C6
Factores quimiotácticos, leucocitos polimorfonucleados, leucocitos mononucleados	C5a

NETER y cols. (1956) observaron que para sensibilizar eritrocitos hay que calentar la endotoxina a 100° C y esto hace que se disgregue, sin perder sus cualidades antigénicas, haciéndola más reaccionante. Sin embargo, las diferencias observadas en la estructura del LPS no pueden explicar la diferente activación del complemento que se obtiene en el caso del LPS y cuando se trata de eritrocitos LPS-sensibilizados. Ello no obstante, el LPS calentado, aunque produce una descomplementación menor que el no calentado, es capaz de descomplementar igualmente el suero absorbido y el no absorbido. Parece ser que la asociación con la membrana de eritrocitos interfiere de alguna manera con la capacidad de la endotoxina para activar la vía alternativa. Esto está de acuerdo con los resultados de FRANK y cols. (1973).

La vía alternativa del complemento o sistema properdina consta de varias proteínas de las cuales, hasta 1975, se han caracterizado 7. El equivalente al C1 no se ha identificado; se piensa que es el factor nefrítico (IF) y que al añadirlo a suero normal, consume el C3 e inicia la formación del complejo C5b-9 (ARROYAVE y cols. 1974). La función de éste factor es independiente del C1, C2 y C4 pero requiere la presencia de C3, del proactivador de C3, de la C3 convertasa del proactivador (C3PAsa), y posiblemente también de properdina. Esta última es una γ -globulina del tipo 7S (no inmunoglobulina), según se ha visto por VALLOTA y cols. 1974, y en el suero se encuentra en forma inactiva (STITZEL y SPITZER, 1974).

La properdina es una glicoproteína, con 4 subunidades. El proactivador C3 (C3PA, B) es una γ -globulina (con una sola cadena polipeptídica), precursora de la enzima que rompe C3

(GÖTZE y MÜLLER-EBERHARD, 1971), y es capaz de formar un complejo enzimáticamente activo con una glicoproteína del veneno de serpiente. La enzima C3Pasa rompe el C3PA en dos fragmentos antigénicamente distintos, uno que se comporta como una α -globulina y otro como una γ -globulina (Bb); este último tiene alguna actividad de rotura del C3, denominándose activador C3 ó C3A.

La C3P-asa (\bar{D}) se ha aislado recientemente (GÖTZE 1975), posee una sola cadena polipeptídica, y se encuentra en el suero en forma activa e inactiva. Puede activarse por properdina o por tripsina.

En la Fig. 13, aparece un esquema de lo que se sabe en la actualidad de la vía alternativa. Esta consta de dos reacciones, la primera de las cuales es properdina dependiente y C3b independiente, mientras que la segunda es properdina independiente y C3b dependiente.

La enzima C3b,Bb puede unirse a la superficie de partículas tales como paredes de hongos o células animales. Las células linfoblásticas con un receptor de C3b de alta actividad adsorben el C3b por medio del mecanismo de inmunoadherencia y son destruidas por los últimos componentes del complejo en una reacción C3PA-dependiente (THEOFILOPOULOS y cols. 1974). También se puede unir el C3bBb a la superficie de eritrocitos que contienen además de C3b, B y \bar{D} . Estas células se lisan por el C3-C9.

SISTEMA PROPERDINA

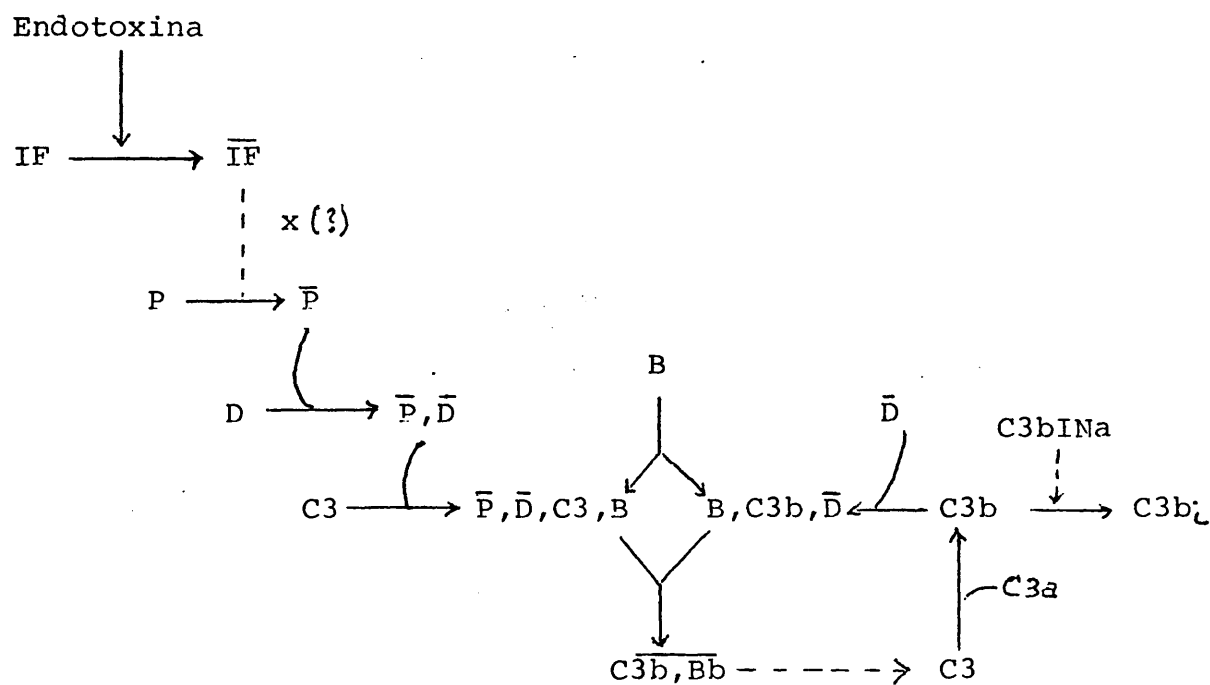


Fig. 13.- Modo de acción de la vía alternativa en presencia de endotoxina. (Explicación en la página siguiente).

Explicación correspondiente a la Fig. 13..- Las reacciones de la izquierda corresponden a la iniciación de la vía p-dependiente y los de la derecha constituyen un sistema de retroalimentación (feedback) positivo, dependiente de C3. Ambas reacciones recogen al proactivador de C3 (B) y dan lugar a la formación de la C3 convertasa que consta seguramente de C3b , Bb. Al unirse a activadores (agregados de IgA, inulina, LPS) convierte el IF en su forma funcional IF, que junto con factores séricos convierte el P en \bar{P} . \bar{P} activa el precursor de proactivador de C3 convertasa ($D \rightarrow \bar{D}$). Los componentes \bar{P} , \bar{D} , C3 y B interactúan para dar lugar a la C3 convertasa. Esta enzima ataca al C3, liberando el C3b y empieza a funcionar el control de retroalimentación (feedback). El C3b se controla por el inactivador C3b (C3bINA). De forma no bien conocida hasta la fecha el C3b , B, b se convierte el C5 convertasa, que cataliza la unión de un complejo citolítico C5b-9. Las anafilatoxinas C3a y C5a son productos intermedios de la reacción.

4. El fenómeno de tolerancia inmunológica inducido por endotoxinas.

Una molécula de LPS funciona como antígeno convencional en cuanto que es capaz de inducir una tolerancia inmunológica, que es tan específica como la respuesta inmune; pero el LPS, a diferencia de otros antígenos, induce esta tolerancia únicamente a dosis altas. MÖLLER (1972) sugiere que la tolerancia a dosis bajas afecta a las células T, mientras que a dosis elevadas afecta a células B y T; ya que el LPS, según estos autores, es un antígeno timoindependiente y parece lógico que su tolerancia sólo se induzca a dosis altas.

A pesar de que la tolerancia frente a LPS origina una ausencia de células productoras de anticuerpos, se ha encontrado que los animales tolerantes a LPS también poseen un número mayor de células con receptores para este antígeno. MÖLLER y SJÖBERG (1972) observan que las células con receptores para LPS eran sólo de origen B y también sugieren que -en animales tolerantes- las células se hallan bloqueadas, no pudiendo exhibir su reactividad inmunológica (MÖLLER y cols; 1973). Dado que este bloqueo es inmunologicamente específico, quizás pueda deberse al antígeno, o al anticuerpo, o a ambos. Ello no obstante, otros autores (ZAN-BAR y cols, 1975) opinan que en la tolerancia inmunológica es muy probable que las células T supresoras jueguen un papel importante.

También las endotoxinas son capaces de ejercer otro tipo de efectos, ya que pueden dar por terminado un estado de inmuno-tolerancia (NETER, 1969). ORNELLAS y cols. (1974), estudiando el efecto de la endotoxina sobre el proceso tolerogénico, encuentran que el LPS interfiere con la inducción de tolerancia,

de tal forma que convierte una señal tolerogénica o debilmente inmunogénica en inmunogénica activa.

CHILLER y WEIGLE (1973) han demostrado este mismo fenómeno utilizando un sistema de transferencia adoptiva en ratón. Estos autores, lo mismo que los anteriores, encuentran que el LPS no afecta a la tolerancia inducida por células T, pero sí a la inducida por células B. Estos resultados no están de acuerdo con los obtenidos por ARMERDING y KATZ (1974), que parecen demostrar que la endotoxina actúa a nivel de células T, al menos como adyuvante. ORNELLAS y cols. (1974) postulan que una señal mitogénica en un momento adecuado, sobre la superficie de las células B (o T) que acaban de interaccionar con el tolerógeno, puede actuar como una "señal secundaria", que activa estas células hacia una respuesta inmune.

Cuando estas células se han hecho tolerantes irreversiblemente, ya no puede actuar ninguna "señal secundaria"

5. Sobre la inmunosupresión inducida por endotoxinas.

Las moléculas de LPS, independientemente de que sean capaces de incrementar la respuesta inmune, también pueden suprimirla y según parece, el lipido A es el responsable de esta actividad, seguramente.

En la Figura 14 aparece un diagrama de los acontecimientos celulares de la respuesta inmune; como se puede ver, el macrófago ocupa una posición central, ya que reacciona con el antígeno e interacciona con las células T y B en sus activi-

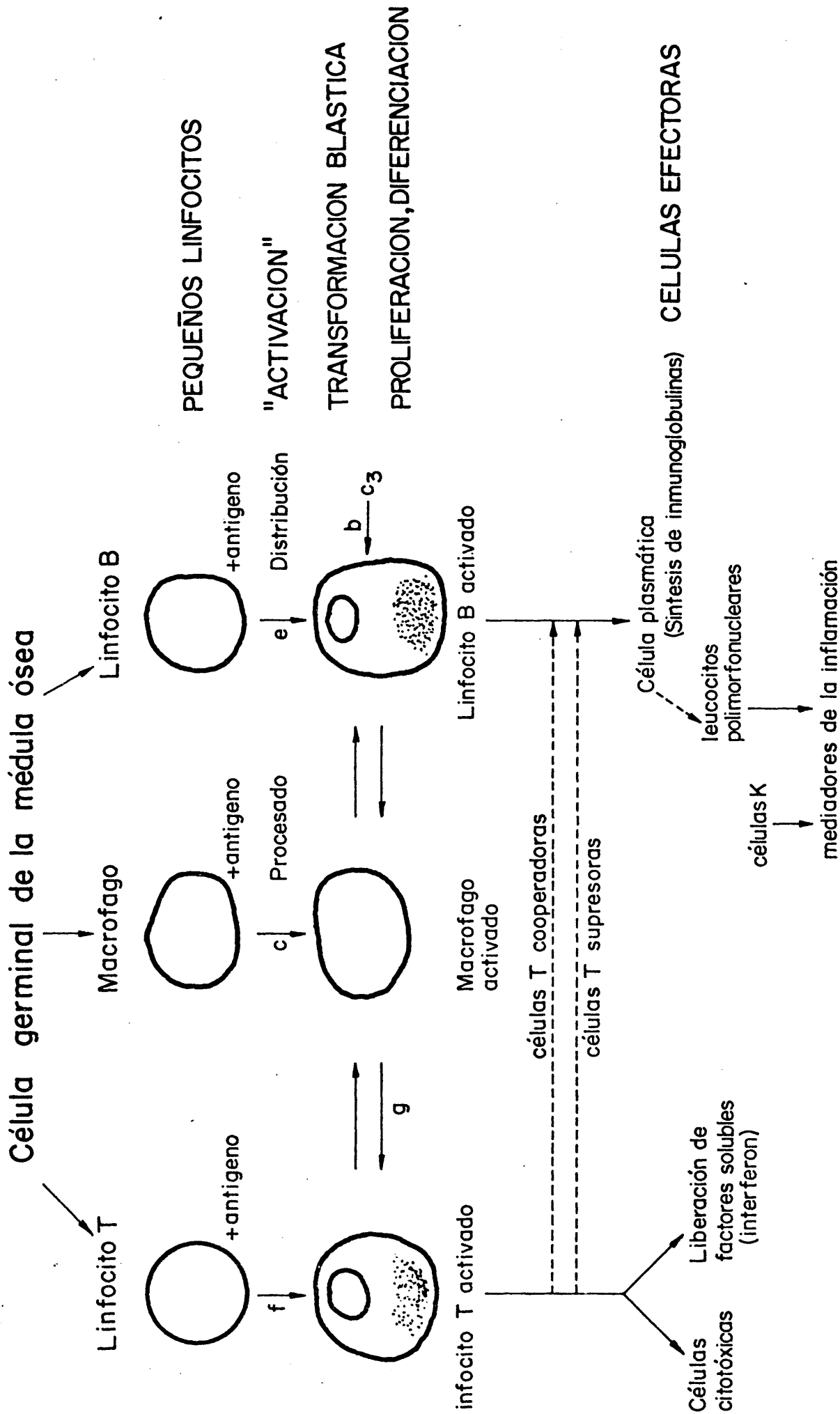


Fig. 14.- Esquema simplificado de la respuesta inmune según SCHWAB (1975) y sitios específicos en los que esta respuesta puede ser inhibida por el LPS

dades tanto receptoras como efectoras. Estos tres tipos de células se derivan de células germinales de la médula ósea. Los macrófagos procesan la mayoría de los antígenos, poniendo en contacto los determinantes específicos del portador y del antígeno con los receptores específicos existentes en las células T y B respectivamente (UNANUE y cols. 1969). Se demuestra que el macrófago experimenta una activación porque se detecta un claro aumento en su síntesis de proteínas, en la producción de factores que afectan la función de las células T y en la citotoxicidad para ciertas células vulnerables (UNANUE, 1972). Por otra parte, el linfocito B, una vez estimulado, puede producir anticuerpos citofílicos para las membranas de los macrófagos que intervienen en la reacción del macrófago con el antígeno (NELSON, 1969). La célula T puede también afectar a la función de los macrófagos, liberando un complejo (IgM)-antígeno (o un IgT-antígeno, según FELDMAN y cols. 1974) que puede reaccionar con las membranas de los macrófagos (RHODES, 1973).

Las células T, aparentemente estimuladas por el antígeno, pueden diferenciarse en diversas subpoblaciones: las células cooperadoras, que amplifican la respuesta de las células B al antígeno y otra subpoblación constituida por las células supresoras, capaces de suprimir la respuesta de los linfocitos T y B que no han sido estimulados.

Esta población ha sido descrita perfectamente por GERSHON y cols. (1972) y por BARTHOLD y cols. (1974).

Según esto, las funciones cooperadoras y supresoras pueden quizá, reflejar dos actividades alternativas de una célula reguladora (GERSHON, 1974). Una tercera población de timocitos, comprende las células T efectoras que se estimulan para liberar una variedad de linfoquinas, que son mediadoras de la inflamación. KAPP y cols. (1974), ponen en duda la existencia de estas tres poblaciones distintas e, incluso, si las células T inmunocompetentes pueden diferenciarse en células cooperadoras y supresoras.

Las células B estimuladas por el antígeno, se diferencian en células formadoras de anticuerpos, que a su vez pueden producir inmunoglobulinas que dan lugar a una inhibición de retroalimentación (HAUGHTON y MAKELA, 1973, UHR y MÖLLER, 1968). Los basófilos y las células cebadas se estimulan cuando la IgE que tienen unida a su membrana reacciona con el antígeno, liberando mediadores de hipersensibilidad inmediata (histamina, serotonina, etc). Por su parte, los leucocitos polimorfonucleares -después de ingerir los complejos anticuerpo-complemento- liberan otros mediadores de la inflamación (enzimas y proteínas cationicas de los lisosomas). Todas estas células que son efectores importantes de la inflamación, originada por la presencia de anticuerpos, se denominan en la Fig. 14 como leucocitos polimorfonucleares. Otro tipo de células, son las capaces de activarse por medio de un receptor que reconoce el complejo anticuerpo-antígeno de la célula vulnerable, transformándose en una célula citotóxica (MacLENNAN y HARDING, 1970 y mas tarde MacLENNAN y HARDING, 1974). Todo esto constituye los mecanismos celulares de la inmunidad mediada por células, dependientes de anticuerpos, y que se desarrolla por una serie de diferentes clases de células efectoras.

Estas células y la dinámica de su funcionamiento se han descrito en un trabajo de MacLENNAN y HARDING (1974), en el que se incluyen las células K (células no adherentes, no fagocíticas, sin inmunoglobulina y que no son células T), las células B, macrófagos y otras.

En la misma figura de referencia, se indican mediante éstas, los sitios donde las endotoxinas bacterianas pueden probablemente actuar y haciéndolo de un modo que influyan tanto en la inducción como en la de expresión de la reacción inmunitaria.

La competición antigénica puede ser una posible explicación de la interferencia que las endotoxinas bacterianas producen en la inmuno-respuesta.

Esta competición antigénica es timo dependiente y, GERSHON (1974), sugiere que esta supresión es el resultado de una sustancia inhibidora no específica, que se libera a partir de timocitos estimulados. FELDMAN y cols. (1974) suponen que el complejo IgT-antígeno, de las células T, se une a receptores de macrófagos, evitando que otros complejos antígeno-IgT se unan a este receptor. De esta forma, el sitio donde ocurre la competición antigénica es la superficie del macrófago.

En los trabajos de JOHNSON y cols. (1967), FRANZL y McMASTER (1968) y McMASTER y FRANZL (1968) aparece que la endotoxina de Salmonella typhi puede funcionar, ya aumentando, ya suprimiendo, la formación de anticuerpos en ratón inmunizado

con SRBC. La dosis, la vía utilizada y los tiempos de inyección de la endotoxina y el antígeno, son determinantes importantes. Si el antígeno, se da con la endotoxina -o poco tiempo después- se obtiene un incremento de la respuesta en anticuerpos. Por el contrario, si la endotoxina se inyecta de 1 a 2 días antes que el antígeno -y por la misma ruta-, se suprime y seguramente se inhibirá completamente la formación de anticuerpos. FRANZL y McMASTER (1968) sugieren que esta respuesta puede reflejar diferentes componentes de la molécula de LPS. Así, la actividad inhibidora podría estar asociada con lípidos no firmemente unidos, mientras que la acción estimuladora dependería de la porción tóxica, aunque no existen datos que apoyen definitivamente esta hipótesis. FINGER y cols. (1971) han encontrado una supresión significativa en ratones inyectados con altas dosis de endotoxina y FRANZL y McMASTER (1968), mediante un estudio histológico, observan que todos los ratones tratados con endotoxina muestran una disminución drástica de linfocitos en el bazo y nódulos linfáticos. Como conclusión se puede sacar que la supresión producida por endotoxina se debe, quizá, a un efecto linfotóxico (Fig. 14, punto a).

Si la endotoxina se inyecta simultáneamente con el antígeno se produce una regeneración rápida del tejido linfoide, seguida de formación de anticuerpos. No se sabe aún como están relacionados estos cambios con los efectos mitogénicos de la endotoxina observados "in vitro", pero lo que sí parece claro es que su actividad mitogénica está asociada con el lípido A (PEAVY y cols. 1973). Varios autores (McMASTER y FRANZL 1968 entre otros) -por estudios histológicos- han observado que los linfocitos más afectados por las endotoxinas son los timocitos.

Por el contrario, los estudios "in vivo", demuestran que el lípido A de las endotoxinas estimula selectivamente las células B. Mas aún, otros autores indican que la endotoxina sustituye la función de las células T requeridas en una respuesta frente a SRBC, convirtiéndola en timo-independiente (MÖLLER y cols. 1972). Esto quizá hable en favor de que se efectue una mitogénesis directa sobre las células B por parte de la endotoxina, aumentando la respuesta al antígeno. De acuerdo con la sugerencia de DUKOR y cols. (1974), la endotoxina suple la necesidad de células T para la activación de C_3 por la ruta alternativa de la cual hablamos en el apartado correspondiente. Esto se basa en el concepto de que las células B requieren 2 señales: una de ellas, la unión específica al antígeno y, una segunda señal, que se puede emitir por las células T cooperadas al ligar el factor C_3 o bien, directamente, por algún antígeno T-independiente (PRYJMA y cols. 1974).

De todas estas observaciones "in vitro" e "in vivo", SCHWAB (1975) concluye lo siguiente: cuando la endotoxina se inyecta se origina un agotamiento selectivo de las células T. Si el antígeno se inyecta al mismo tiempo, puede ocurrir también un efecto sinérgico del antígeno y la endotoxina, sobre las células B, dando lugar a un aumento de la respuesta. En este caso la endotoxina da lugar a segunda señal ya directamente o indirectamente a través de la unión del C_3 y por último condiciona una respuesta T-independiente. Si el antígeno se retrasa durante 2 días las células T todavía están agotadas, y las células B han sido estimuladas parcialmente para diferenciarse por la unión del C_3 . Esto origina que estén defasadas en una respuesta frente al antígeno y puedan dar lugar a una respuesta del tipo de inmunosupresión. De acuerdo con este concepto el efecto principal

de la endotoxina está en el punto b de la fig. 14

BRADLEY y WATSON (1964) fueron los primeros en estudiar la inmunosupresión producida por endotoxina de E. coli. Sus resultados difieren de los de FRAZL y McMASTER en tres aspectos importantes: a) la endotoxina es efectiva especialmente si se la dá durante un periodo de 6 días después de administrar el antígeno y el suero se recoge el día 7; b) la respuesta solamente se retrasa, ya que si se deja de dar la endotoxina el día 3, los niveles de anticuerpos son iguales o mayores; y c) la endotoxina origina una desaparición más rápida de anticuerpos del suero. Estas observaciones sugieren que el efecto de la endotoxina sobre la respuesta inmune es bastante diferente a lo obtenido por otros autores.

WHANG y cols. (1965) sugieren un tercer modo de actuación: La supresión de la formación de anticuerpos, frente a un antígeno de Enterobacteriaceas en conejos, ocurre únicamente cuando el antígeno y la endotoxina se incuban juntas antes de la administración. En este caso la interferencia ocurre a nivel del sitio c (Fig. 14)

FLOERSHEIM y SZESZAK (1972) han estudiado también la supresión de la inmunidad celular producida por endotoxinas. Estos autores, observaron una disminución del sistema efector de la hipersensibilidad retardada (Fig.14 sitio d). Sugieren que la endotoxina puede alterar la distribución de linfocitos antígeno-sensibles (sitio e fig. 14) o afectar a la permeabilidad de la membrana celular. FLOERSHEIM y cols. (1972) observan que las endotoxinas, además de inhibir las células efectoras, pueden inhibir la inducción de la inmunidad celular (Fig.14 sitio f). NELSON (1973) observa que los macrófagos estimulados,

procedentes de animales inyectados con endotoxina, suprimen la respuesta de linfocitos frente a un antígeno (Fig.14 sitio g).

Recientemente, HOFFMANN y cols. (1975), observan que bajo las mismas condiciones experimentales las moléculas de LPS pueden aumentar la producción de anticuerpos, independientemente de las células T y del antígeno (como una respuesta policlonal) e inhibir la producción de anticuerpos dependientes de células T. En otras palabras, el LPS induce una respuesta frente a eritrocitos de carnero en ausencia de células T maduras, pero inhibe la función cooperadora de timocitos maduros antígeno-específicos.

Según estos autores, el LPS puede ejercer su acción inhibidora sobre la respuesta inmune dependiente de células T de varias formas: a) Interfiriendo con la activación de las células T; b) Interfiriendo con el reconocimiento celular específico necesario para la producción de una respuesta inmune; c) Inactivando los productos celulares de las células T que estimulan las células B; y d) reduciendo la sensibilidad de las células B frente a la estimulación ejercida por las células T. La adición de células T activadas, no revierte la supresión ejercida por el LPS sobre la formación de anticuerpo, indicando que la carencia de células T activadas (por si sola) no es responsable de esta supresión. Sus resultados sugieren que la estimulación producida por las células T es requerida durante toda la respuesta inmune y no tan sólo al principio. Así, las células de bazo de animales inmunizados, continúan produciendo anticuerpos frente a eritrocitos de carnero "in vitro" únicamente mientras existan células T; en experimentos "in vitro", utilizan-

do distintas proporciones de células B y T, se observan que es necesaria una actividad continuada de células T. Como quiera que el LPS tan sólo suprime la formación de anticuerpos cuando se añade a cultivos de células de bazo simultáneamente con el antígeno (o antes que éste) y dado que la adición posterior de LPS no solo no suprime, sino que aumenta la respuesta, puede ocurrir que este LPS no interfiera con las reacciones de cooperación celular que parecen ser necesarias durante toda la respuesta inmune. El LPS, probablemente, hace que las células B no sean capaces de recibir las señales de las células T o que las células encargadas del reconocimiento celular no puedan efectuar un contacto adecuado. Estos autores terminan concluyendo que el LPS suprime la producción de anticuerpos dependiente de células T "in vitro", a diferencia de lo que se ha observado hasta la fecha en muchos laboratorios.

WATSON y cols. (1973 a, 1973 b) observan que al exponer cultivos de células de ratones nu/nu (desnudos) a LPS, antes de añadir eritrocitos de carnero, se inhibe la producción de anticuerpos frente a eritrocitos de carnero; mientras que cuando se añaden simultáneamente el LPS y el antígeno, los cultivos con una respuesta baja se estimulan, pero se inhiben los de respuesta alta.

Por último, aunque no están directamente implicados con la acción inmunosupresora del LPS, consideramos de gran interés comentar una serie de resultados en relación con la actividad de las endotoxinas sobre la respuesta inmune en presencia de interferon, ya que la producción de éste último es capaz de estimularse en presencia de LPS bacterianos.

Como es sabido, el interferón es una de las linfoquinas liberadas "in vitro" a partir de linfocitos sensibilizados, específicamente, por entrar en contacto con virus (RASMUSSEN y cols. 1974) o -en el caso de leucocitos humanos o murinos- por quedar sometidos a la acción de mitógenos tales como fito-hemaglutinina, concanavalina A, LPS y otras sustancias. También se puede producir interferon, en cultivos mixtos de linfocitos de ratón, cuando existen entre ellos diferencias en cuanto a los antígenos de histocompatibilidad.

Referente a los ensayos "in vivo" se produce también interferón, según ya hemos visto en un apartado anterior, en presencia de LPS o durante procesos de inmunización primaria frente a eritrocitos xenogénicos (SVETMOLDAWSKY y cols. (1974)).

JOHNSON y cols. (1975) han demostrado que la adición de interferón a cultivos celulares "in vitro" inhibe la respuesta de las células formadoras de anticuerpos y también, se ha comprobado "in vivo" que la presencia de interferón es capaz de suprimir la formación de células sintetizadoras de anticuerpos y llegar a inhibir la reacción injerto-huesped, con lo que -de esta forma- puede prolongarse la duración de trasplantes en ratón.

Recientemente, BRODEUR y MERIGAN (1974) demuestran que el tratamiento con interferón, antes de la administración de eritrocitos de carnero, suprime significativamente la producción de hemolisina circulante y la de anticuerpos aglutinantes. También la administración "in vivo" de interferón es capaz de inhibir la síntesis de DNA inducida "in vitro" por mitógenos específicos de células B y T. Así, de esta forma, se suprime la

respuesta primaria y secundaria frente a eritrocitos de carnero "in vitro".

Mas adelante, estos mismos autores (BRODEUR y MERIGAN 1975), demuestran que la respuesta en IgM, producida por LPS de S. typhimurium, se reduce bastante en animales tratados con interferón y ello sugiere que esta linfoquina puede afectar a las funciones de las células T y B. Otros autores, trabajando sobre conejos, han encontrado que el interferón puede inhibir la respuesta proliferativa de linfocitos frente a un antígeno, pero no afectan a su respuesta inmuno especifica frente a eritrocitos de carnero.

BRODEUR y MERIGAN (1975) observan que este efecto inmunodepresor del interferón es dependiente del momento de administración y de las dosis empleadas en el tratamiento. La máxima inhibición ocurre durante la fase inductiva de la respuesta inmune; sin embargo, cuando se administra poco tiempo después del antígeno, da lugar a un aumento en la respuesta de anticuerpos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en otros laboratorios (GISLER y cols., 1974 y JOHNSON y cols. 1975). El efecto estimulador sobre los linfocitos implicados en la respuesta, puede tener lugar por medio de un efecto inhibidor del interferón sobre la función de las células T supresoras.

Estudiando la inmunosupresión de las células B, producida por administración de interferón "in vivo", se ha visto que no requiere la presencia de macrófagos en los cultivos estimulados con LPS. JOHNSON y cols. (1975) observan que la acción inhibidora del interferon "in vitro", sobre la respuesta frente a eritrocitos de carnero, se debe a las células B; sin embargo

la supresión "in vivo" puede alcanzar también a las células T.

El interferón, del mismo modo que otras sustancias inmunosupresoras, puede activar una determinada población de macrófagos del bazo, originando una retención del antígeno, seguida de la destrucción de éste y no permitir la liberación del material necesario para desencadenar la proliferación celular y la síntesis de anticuerpos en linfocitos T ó B, cuya síntesis de RNA mensajero está ya disminuida previamente por el interferón. Otra posibilidad es que -el interferón- sintetizado en linfocitos, sometidos a estimulación mitogénica o antigénica, pueda regular mediante un mecanismo de retro-alimentación la función de estos linfocitos inhibiendo la blastogénesis así como la replicación viral y la proliferación tumoral.

Por otra parte, dado que las células T son células productoras de interferón, es posible que esta sustancia actúe como un intermediario importante que sirve de inmunoregulador de las células T supresoras.

VII. ACTIVIDAD MITOGENICA DE LAS ENDOTOXINAS

Los lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas se consideran generalmente como mitógenos específicos de los linfocitos B (PEAVY y cols. 1974) y como antígenos independientes frente a los linfocitos T (COUTINHO y cols. 1974). El término general de mitógeno se aplica en Inmunología a sustancias, de muy diverso origen, que tienen la facultad de estimular a los linfocitos. Dicha estimulación consiste en un incremento del metabolismo y síntesis de DNA, desarrollo de la transformación blástica y eventualmente mitosis, síntesis de inmunoglobulinas, etc, como se puede ver en los sucesivos apartados que siguen.

1. Activación de linfocitos

Los LPS a dosis elevadas (1-100 μ g/ml) actúan como mitógenos, mientras que a dosis bajas son inmunógenos. Actuando como mitógenos, son capaces de inducir la síntesis de IgM en células B "in vitro" (MELCHERS y ANDERSSON, 1973), activando hasta un 50% de la población de dichas células. Al analizar la especificidad de los anticuerpos producidos, en células estimuladas por LPS, se observa que se trata de una producción policlonal de anticuerpos debido a la heterogeneidad de las células que los sintetizan. Dichos anticuerpos son de baja afinidad y se pueden considerar inespecíficos, ya que su produc-

ción no se ha originado por la presencia del antígeno específico correspondiente.

Los LPS "in vivo", como ya hemos visto, modifican a los eritrocitos de carnero haciéndolos antígenos timo-independientes (ANDERSSON y cols. 1972). En cuanto a la producción de anticuerpos "in vitro", también son capaces de sustituir la función de las células T (WATSON y cols. 1973) e incluso, también, la de los macrófagos (ANDERSSON y cols. 1972).

SHEID y cols. (1973) observan que los LPS son capaces de inducir la diferenciación de las células T a partir de precursores pre-tímicos. Es decir, la molécula de LPS no activa directamente las células B en ausencia de células T, sino que induce la diferenciación de éstas a partir de sus precursores y, entonces, estas células T generadas "in vitro" serán la que lleven a cabo la cooperación T - B.

BONA y cols. (1974) han encontrado que los LPS tienen poco efecto sobre las células B de otras especies animales que no sean murinas, hecho que es difícil de explicar si se considera al LPS un mitógeno de células B.

KAGNOFF y cols. (1974) han sugerido, recientemente, que el LPS sólo afecta la mitogenicidad o la respuesta en anticuerpos de las células B, si también están presentes células T, en el cultivo. AMERDING y KATZ (1974) observan que en un sistema de células de bazo murinas, en el que se mide la respuesta primaria en anticuerpos frente a conjugados hapteno-proteína,

el LPS es capaz de activar las células B o T dependiendo de las condiciones empleadas. En ausencia de un antígeno específico, la molécula endotóxica actúa sobre los linfocitos B, mientras que en presencia del antígeno específico-este mismo LPS- condiciona la función cooperadora de las células T dando lugar a un efecto coadyuvante. El LPS aumenta específicamente la capacidad de células previamente inmunizadas con la proteína portadora para amplificar la respuesta antihapteno frente a conjugados hapteno-proteína "in vitro". Los autores no establecen si este efecto está mediado por interacción del LPS con las células T inmunizadas frente al portador o por otro mecanismo aún no conocido.

OZATO y cols. (1975) demuestran que los lipopolisacáridos bacterianos actúan sinérgicamente con concanavalina A (mitógeno específico de células T), aumentando la síntesis de DNA en linfocitos tímicos y disminuyendo la dosis de concanavalina A necesaria para una mitogénesis máxima. El LPS parece que actúa sobre los timocitos resistentes a cortisona, o positivos, en las primeras etapas del desencadenamiento de la proliferación celular inducida por concanavalina A. Los LPS, por sí solos no producen estimulación mitogénica sobre las células T pero sí afectan indirectamente a esta estimulación.

SCHMIDTKE y NAJARIAN (1975) observan que una combinación de algunas lectinas extraídas de plantas y que son mitógenos específicos de los timocitos (fitohemaglutinina o concanavalina), junto con LPS de bacterias Gram-negativas, da lugar a un efecto sinérgico sobre la respuesta blastogénica de linfocitos de sangre periférica humana, como se comprueba por los incrementos de incorporación de timidina tritiada que se pro-

ducen en estas condiciones experimentales. Sin embargo, el LPS no ejerce directamente un efecto mitogénico significativo sobre los linfocitos humanos. Sugieren, igual que otros autores que hemos nombrado anteriormente, que -en el hombre- el LPS puede intervenir o modificar de alguna forma la actividad de las células T.

El efecto sinérgico sobre la síntesis de DNA, en linfocitos de sangre periférica humana, producido en presencia de fitohemaglutinina o concanavalina A y LPS, refleja que hay un incremento del número de células que responden a estos mitógenos si se compara con la proporción de células que responden a cada uno de ellos por separado; no existiendo datos sobre la presencia de algún otro tipo de células que actúen coordinadamente en esta misma respuesta. El LPS, en cantidades crecientes y en presencia de cantidades constantes de Con A, origina aumentos proporcionales en la respuesta sinérgica de estos linfocitos. Por el contrario, cantidades crecientes de Concanavalina A, en presencia de una cantidad constante de LPS, no dá lugar a incrementos en este efecto sinérgico. Ello no obstante, se ha comprobado que el LPS en combinación con Concanavalina A no parece ser citotóxico.

Los resultados obtenidos con fitohemaglutinina y LPS sugieren también la participación de diferentes tipos de células.

Otros autores, como FORBER y cols. (1974), observan también que el LPS estimula la incorporación de timidina tritiada en células del timo, en presencia de cantidades de concanavalina A que son muy poco mitogénicas. Concluyen que los mitógenos de

células T, pueden modificar estas células de forma que puedan responder a LPS. GERY y cols. (1973), por otra parte, han encontrado que los linfocitos de sangre humana, incubados con fitohemaglutinina o LPS, liberan al medio de cultivo factores que son mitogénicos para los timocitos de ratón. Estos factores potencian también las actividades mitogénicas de la fitohemaglutinina y de la concanavalina A en linfocitos humanos. Sin embargo, algunos autores (DIAMANSTEIN y cols. 1973) observan que varias combinaciones de LPS y fitohemaglutinina no ejercen ningún efecto sobre la síntesis de DNA en células de timo de ratón

Como se puede observar, aparece bastante controversia sobre este tema, existiendo varias cuestiones todavía sin dilucidar como son las siguientes: a) El LPS, para aumentar la síntesis de DNA por encima de la inducida únicamente por Concanavalina A o fitohemaglutinina, no se sabe si se une tan sólo a los linfocitos o si se une también a los otros dos mitógenos, incrementando su capacidad de activación; b) El efecto estimulador observado por algunos autores, quizá se deba a la producción de factores solubles que al liberarse en los cultivos facilitan la acción del LPS sobre otra población de células; y c) Las células afectadas por la combinación de mitógenos son las T y las B, o únicamente una de ellas.

Como BRUNSON y WATSON (1975) observaron que algunas preparaciones comerciales de Concanavalina A producían actividades similares a las del LPS, es decir, inducción de una respuesta fébril, gelificación del lisado de limulus, etc- recomiendan que ésto se tenga en cuenta siempre que se trabaje con Concanavalina A, debiéndose establecer los oportunos controles.

VAN DEN BERG y BETEL (1974), estudiando los efectos del LPS sobre la membrana celular, encuentran que la síntesis de DNA inducida por LPS en las células B se encuentra precedida de un aumento en la incorporación de aminoácidos en la célula; en el caso de concanavalina A, este aumento en la incorporación de aminoácidos tiene lugar precisamente en los timocitos.

2. Mecanismos desencadenantes de la proliferación linfocitaria.

OZATO y cols. (1975) observan que el LPS, debido a su naturaleza anfipática, se puede insertar en la membrana del linfocito, modificándola y dando lugar a un cambio en su fluidez. La reducción producida por el LPS del número de moléculas de Concanavalina A necesarias para desencadenar la proliferación celular se puede explicar por los siguientes mecanismos: a) El LPS, al unirse con la membrana del linfocito, podría promover un cambio en la fluidez de ésta y movilizar los componentes de membrana, con lo que el entrecruzamiento de los receptores de Concanavalina se hace mas efectivo, y dan lugar, finalmente, a una concentración local sobre la membrana de moléculas de Concanavalina mas activa; b) Otro posible mecanismo puede ser que el LPS se una específicamente con la Concanavalina A y posibilite una interacción mas efectiva de las moléculas de Concanavalina con los linfocitos. Sin embargo, el efecto del LPS no debe ser seguramente éste, porque no se ha detectado una mayor unión de las moléculas de Concanavalina en presencia de LPS; c) también puede ocurrir que el LPS lo que hace es estabilizar la unión de la Concanavalina A al linfocito. La constante de afinidad de la Concanavalina A, para su receptor en el linfocito, es bastante baja y tiene que estar presente en el medio del orden de 10^{-18} a 10^{-19} M para llegar a

estimular la síntesis de DNA; y d) finalmente, otro efecto del LPS pudiera ejercerse sobre las enzimas localizadas en la membrana, dando lugar a cambios en los niveles de cAMP o cGMP que pueden a su vez influir en las interacciones de la Concanavalina A con la membrana celular.

Varios investigadores han estudiado los cambios biológicos que se producen cuando una célula en reposo se convierte en un tipo celular capaz de sintetizar DNA y dividirse mitóticamente y también han estudiado las posibles implicaciones de los nucleótidos cíclicos en la regulación de esta proliferación celular (HIRSCHORN, 1974, GOLDBERG y cols. 1974). Así se ha observado que cuando los linfocitos de sangre periférica se ponen en contacto con altas concentraciones de mitógenos aparece un aumento en los niveles de cAMP a los pocos minutos del tratamiento (HIRSCHORN, 1974); sin embargo, dosis elevadas de cAMP son capaces de inhibir la síntesis del DNA de linfocitos inducida por mitógenos.

También hay cierta evidencia que indica que el cGMP es un agente regulador de la proliferación de linfocitos, aunque exista un cierto confusionismo del mecanismo biológico de este proceso. WHITFIELD y cols. (1971) y WHITFIELD y MacMANUS (1972), observan que el cGMP, a altas y bajas concentraciones, puede incrementar el contenido en cAMP y por lo tanto estimular la proliferación celular. Las concentraciones de cGMP intermedias son capaces de estimular o, por el contrario, inhibir la mitosis de las células que sintetizan DNA según sea su contenido intracelular en cAMP y la concentración de calcio extracelular.

HIRSCHORN (1974) observa que el cGMP inhibe mejor que el cAMP el aumento de síntesis de DNA inducido por fitohemaglutinina en cultivos de linfocitos. HADDEN y cols. (1972) han demostrado que el tratamiento con mitógenos produce un incremento de diez veces, por lo menos, en los niveles de cGMP durante los 20 primeros minutos de exposición al agente mitogénico. Esto está de acuerdo con lo sugerido por GOLDBERG y cols. (1974). Según parece, durante la iniciación de la proliferación, un ligero aumento de la concentración de cGMP sirve de señal mitogénica para inducir el proceso proliferativo. Además el cGMP puede quizá aumentar el transporte de Ca^{++} dentro de la célula.

PASTAN y cols. (1975) hacen una revisión bastante completa en relación con los efectos de los nucleótidos cíclicos sobre los linfocitos. Así, observan que ocurren una serie de problemas cuando se estudia el proceso proliferativo de los linfocitos, encontrando que la síntesis de DNA inducida por mitógenos no empieza hasta 24 horas después de la exposición frente a fitohemaglutinina, mientras que el periodo de síntesis de DNA es de 50 a 70 horas después del tratamiento con este mitógeno. La señal mitogénica no se expresa inicialmente, mas bien es la continuación de una serie de etapas que ocurren durante el primer periodo de 24 horas. WEBER y cols. (1974), estudiando la cinética de esta estimulación "in vitro" producida por mitógenos en linfocitos, encuentran que la activación de linfocitos "in vitro" es un proceso complejo que se puede dividir en cuatro etapas distintas; tres de ellas son mitógeno-dependientes y la cuarta mitógeno-independiente. Un contacto corto del mitógeno y el linfocito no es suficiente para llevar a las células a la fase de síntesis de DNA; quizá

el mitógeno pueda inducir a una respuesta inmune en estas células, ocurriendo horas mas tarde la señal mitogénica capaz de convertir células en reposo en células proliferativas. TEH y PAETKAU (1974) han observado que el cAMP juega un papel positivo en la primera fase de la respuesta inmune, mientras que es inhibidor durante la fase proliferativa, que comienza a las 24-36 horas después de la activación por el mitógeno. A la vista de estos resultados cabe preguntarse si los cambios iniciales que aparecen en el linfocito estimulado por fito-hemaglutinina, tales como la elevación rápida de los niveles de cGMP (HADDEN y cols, 1972), tienen alguna relación con la iniciación verdadera de la proliferación que ocurre varias horas después.

A pesar de todos estos problemas parece probable que los nucleotidos cíclicos esten implicados en la regulación de la proliferación de linfocitos. Los iones Ca^{++} también son unos potentes reguladores de esta fase proliferativa, aunque todavia no esta perfectamente definida la relación existente entre los nucleotidos cíclicos y el Ca^{++} . Al aumentar los niveles de cAMP se produce una inhibición de la síntesis del DNA inducida por mitógenos y de la división celular. Esto sugiere que la disminución en los niveles de cAMP, quizá asociada con un incremento de cGMP celular, puede actuar como señal de activación para la iniciación del proceso proliferativo de los linfocitos.

3. Maduración de linfocitos y síntesis de inmunoglobulinas

En cuanto a la fase de síntesis de inmunoglobulinas por los linfocitos, QUINTANS y LEFKOVITS (1974) han estudiado el efecto de moléculas de LPS sobre la fase de activación y la subsiguiente expansión clonal de los precursores de células B específicos para la inmuno-respuesta frente a eritrocitos de carnero en microcultivos. De sus resultados, estos autores establecen las siguientes conclusiones: a) El LPS puede activar las células B en ausencia de antígeno; b) las células B estimuladas con LPS, en ausencia de antígeno, sufren una rápida maduración y muy pronto puede observarse una clara disminución del número de células formadoras de anticuerpos; c) la presencia de eritrocitos de carnero, en cultivos estimulados con LPS, neutraliza en parte el efecto del LPS sobre la maduración y conduce a que las células puedan realizar nuevas divisiones.

Las moléculas de LPS, por sí solas, pueden considerarse como agentes que inducen la maduración de las células B y esta maduración va acompañada de una disminución en la sensibilidad frente al antígeno y de un aumento en la producción de anticuerpos. Esto podría explicar lo observado por WATSON y cols. (1973) de que el pretratamiento de células de ratón atímico congénito, con LPS, inhibe posteriormente la respuesta frente a un antígeno. El LPS puede convertir así, las células sensibles al antígeno en células secretoras de anticuerpos que no responden ya al antígeno.

Asimismo, QUINTANS (1974), observa que el LPS puede activar los precursores presentes en las células de ratones atímicos congénitos para producir anticuerpos anti-eritrocito

de carnero, sin que sea necesaria la presencia de antígeno en los cultivos. Sin embargo, esta activación va acompañada de expansión clonal únicamente si los eritrocitos de carnero están presentes en los cultivos. Según este autor, el LPS se comporta no como un mitógeno mas bien como un agente que induce diferenciación de las células B a células productoras de anticuerpos. Esto ocurre en ausencia de una proliferación celular significativa y parece que conduce a estadios celulares terminales sin capacidad de renovación propia; lo que permite explicar el rápido declinar de los clones en los cultivos con y sin eritrocitos. Así, el antígeno parece actuar inhibiendo la diferenciación terminal de los precursores y los conducen hacia la expansión clonal. Otros autores, sin embargo, han observado que la inducción de células formadoras de placas con mitógenos puede ocurrir en ausencia de división celular (ANDERSSON y MELCHERS, 1974). La ausencia de células formadoras de anticuerpos en cultivos de células de ratón "desnudo" (sin reconstituir) no excluye la ausencia de proliferación, ya que lo que puede fallar es la diferenciación final. Es posible que las células B en contacto con el antígeno inicien la expansión clonal y que el único papel del LPS sea el de amplificar este proceso y llevarlo a la diferenciación final, dando lugar a células formadoras de anticuerpos. Este punto de vista ha sido mantenido por HUNIG y cols. (1974) y ASKONAS y cols. (1974).

De todo ello, cabe resumir que un precursor de células B puede diferenciarse directamente y pasar a células formadoras de anticuerpos sin división celular. Ello lleva a la excrección de anticuerpos durante un periodo limitado de tiempo, ya que estas células formadoras de anticuerpos se consideran células terminales. En los experimentos con LPS junto con eritrocitos

de carnero tienen lugar varias divisiones celulares antes de que comience la diferenciación terminal a células formadoras de anticuerpos; estas divisiones permiten expandir el número de células capaces de ulterior diferenciación y cuando ésta tenga lugar, el clono ya no se agota, ya que se ha creado una reserva base de este tipo de células. El término mitógeno no refleja realmente el estado de cosas que suceden. La idea de que los mitógenos inducen mitosis se basa en el hecho de que uno de los índices mas utilizados para determinar la mitogenicidad es la determinación de la incorporación de timidina en el DNA de las células estimuladas. Sin embargo una gran incorporación de timidina tritiada puede indicar que muchas células se dividen o que pocas células entran en división muchas veces. Los resultados obtenidos por QUINTANS, ultimamente citados, parece ser que apoyan la primera alternativa; es decir, que los mitógenos, mas que inducir mitosis producen una diferenciación precoz de los linfocitos.

Por otra parte se sabe que los plasma-blastos, resultantes de la estimulación con LPS, sintetizan y escreten IgM (MELCHERS y ANDERSSON, 1974 a, b; GORMUS y cols, 1974) y que el 86% de estas células, que responden frente al LPS en las primeras fases de la estimulación, poseen receptores del componente C3 del sistema de complemento (CR^+). Después de 48 a 72 horas hay un descenso progresivo del porcentaje celular con este receptor (de 55% a un 39% respectivamente).

GORMUS y SHANDS (1975) intentan conocer algo más estas células y pretenden determinar si el descenso, en las células con receptores de complemento, se origina por una pérdida de receptores en las células transformadas o si resulta de la proliferación de otros tipos de células que carecen del re-

ceptor de complemento. Estos autores encuentran que: a) La estimulación por LPS da lugar a un aumento progresivo en el número de blastos productores de IgM (IgM^+); b) estas células blásticas constituyen aproximadamente el 30% de la población total a las 72 horas de la estimulación con LPS; c) a las 72 horas, del 72 al 84% de los blastos- IgM^+ tenían receptor para complemento y el 16 al 28% no presentaban este receptor de complemento; d) Esta disminución no sucede en el porcentaje de blastos- IgM^+ con receptor de complemento; y e) también han observado un tipo de célula blástica adicional que incorpora timidina tritiada pero que no produce anticuerpos IgM ni tiene receptor de complemento. Estas células constituyen del 11 al 27% de las células totales que incorporan timidina a las 72 horas después de la estimulación por LPS. Así concluyen que la disminución en el número de blastos con receptores de complemento en los cultivos de linfocitos de bazo, estimulados por LPS, no se debe a la pérdida de receptores de las células IgM^+ , sino que seguramente se debe (en parte) a la estimulación y proliferación de otro tipo celular que carece del receptor de complemento. Estas células, aunque se desconoce su papel, parece que no son de origen tímico y también sugieren que la población que responde frente al LPS es muy heterogénea.

DIAMANTSTEIN y cols. (1974) observan que el LPS y el sulfato de dextrano (ambos, mitógenos de células B) actúan sobre diferentes poblaciones de células B de ratón. La población de células B que responde a la estimulación producida por el sulfato de dextrano es menos madura que las células B que responden al LPS, aunque ambas tienen inmunoglobulinas en superficie. Por otra parte, GRONOWICZ y COUTINHO (1974) comprueban que algunos mitógenos de las células B actúan preferentemente induciendo

do la división celular, la síntesis de anticuerpos, o ambas; mientras que el LPS, según estos autores, da lugar a células finales que segregan activamente inmunoglobulinas pero que no pueden sufrir más estimulación, a diferencia del sulfato de dextrano que produce una proliferación celular bastante extensa pero con escasa producción de anticuerpos en la mayoría de las células. Los diferentes mitógenos B actúan sobre células en distintos estados de diferenciación, no conociéndose hasta que punto tienen que diferenciarse las células B de ratón antes de que sean capaces de iniciar la proliferación clonal y la subsiguiente diferenciación en células formadoras de anticuerpos.

Según estos autores, la estimulación mitogénica es similar a las respuestas inducidas por antígeno debido a que el resultado de ambas activaciones es el mismo (aunque la respuesta en el primer caso sea policlonal); de aquí que se pueda utilizar la mitogénesis como un modelo para el estudio del mecanismo que opera durante la inducción de células inmunocompetentes.

ANDERSSON y MELCHERS (1974) observan que -en presencia de hidroxíurea, en que la síntesis de DNA está inhibida- las células B a las 16-24 horas después de la estimulación con LPS se diferencian en células plasmáticas inmaduras; éstas contienen inmunoglobulinas unidas a membrana y algunas intracitoplásmicas; por tanto, son de gran interés para estudiar la dinámica en la producción de anticuerpos.

Las células plasmáticas maduras no contienen inmunoglobulinas de superficie, pero si gran cantidad de Ig intracitoplásmicas. Según los resultados de los últimos autores citados, se pueden distinguir dos estadios en la maduración de las células B, el primero en ausencia de síntesis de DNA en el que se desarrolla un plasmablasto inmaduro y posteriormente una segunda fase de desarrollo en la célula plasmática ya madura que sí requiere una síntesis de DNA.

KEARNEY y LAWTON (1975) observan que, bajo condiciones apropiadas de cultivo, el LPS puede inducir la diferenciación de células productoras de IgM (Día + 5) seguida de la aparición de células productoras de IgG e IgA (día + 6 ó 7) en células del conducto torácico, bazo, nódulos linfáticos y médula ósea de ratón. La respuesta "in vivo" en IgG e IgA es dependiente de la presencia de linfocitos T funcionales y generalmente no ocurre después de la inmunización con antígenos independientes de células T; ello es debido, seguramente, a que estos antígenos no pueden activar los precursores por falta de una señal apropiada de las células T. Sin embargo, estos autores, observan que la producción de IgG e IgA no parece depender de las células T, ya que los cultivos de linfocitos de ratones atímicos congénitos y de los timotimizadas, responden de igual manera que los normales; es decir, tampoco se requiere la presencia de monocitos y macrófagos. Los cultivos de linfocitos de ratón, que carecen de células B, no proliferan ni dan lugar a células formadoras de anticuerpos, en tanto que los cultivos de médula ósea muestran una menor proliferación aunque dan lugar al mismo número de células formadoras de anticuerpos que los otros tejidos. Así concluyen que la población de linfocitos de la médula ósea, se diferencia de la del bazo y nódulos linfáticos, en que tiene menos receptores de inmunoglobulinas capaces de unirse a los antígenos y menos receptores de complemento. Los linfocitos B

de médula ósea están menos diferenciados, pero pueden estimularse por LPS hasta una fase final perfectamente diferenciada; consideran que la capacidad que tienen los linfocitos de activarse por mitógenos, para sintetizar inmunoglobulinas, no debe ser utilizada como un índice de su estado de maduración, en contra de lo que opinan GRONOWICZ y CONUINHO (1974).

4. Efecto de lipopolisacáridos sobre macrófagos

En experimentos "in vivo" se ha observado que la endotoxina también puede originar proliferación de otros tipos de células que no sean linfocitos. Así se puede ver como moléculas de LPS hacen recuperar la función hematopoyética en ratones irradiados y también aumentan el número de colonias de células de bazo en animales irradiados que han sido reconstituidos con células de médula ósea. FORBES y cols. (1965) observan que la endotoxina causa mitosis en macrófagos peritoneales de ratón. Paradójicamente han aparecido trabajos en los que se demuestra que la endotoxina tiene efectos citotóxicos sobre los macrófagos (WEINER y LEVANON, 1968).

SHANDS y cols. (1974) estudian el posible efecto mitogénico del LPS sobre macrófagos tanto "in vitro" como "in vivo". Sus resultados indican que la endotoxina no es un mitógeno para los macrófagos peritoneales de ratón. Los estudios "in vitro" muestran que las células que responden al LPS son las poblaciones no adherentes y no fagocíticas de las células peritoneales; estas células, morfológicamente, son similares a las de bazo. En ocasiones, también se observan un efecto citotóxico originado por la endotoxina sobre las células adherentes.



Cuando se incuban células peritoneales totales con LPS, éste tiene un efecto citotóxico para los macrófagos, disminuyendo o desapareciendo también la mitogénesis de las poblaciones no adherentes. Por otra parte, los resultados "in vivo" indican que no hay estimulación de la división de macrófagos, pero sí aparece el correspondiente efecto citotóxico de la endotoxina sobre los macrófagos peritoneales y células no fagocíticas mononucleares. Finalmente también parece observarse que la división local de los macrófagos es un factor importante en la renovación ("turn over") de los macrófagos peritoneales.

Asimismo, WILTON y cols. (1975) se interesan por la activación que produce el LPS de Salmonella sobre macrófagos peritoneales de cobaya y para ello utilizan un ensayo de incorporación de glucosamina marcada con ^{14}C a los polisacáridos de su membrana celular. Las linfoquinas de linfocitos pueden ejercer una acción sobre la superficie del macrófago, eliminando el radical glicocolilo extra-membranoso; este material también se pierde cuando se inhibe la emigración de macrófagos por el factor correspondiente. La activación de los macrófagos por esta linfoquina tiene su máximo a los tres días de cultivo, conduciendo esta activación a una síntesis de nuevo del glicocolilo con un aumento de la incorporación de glucosamina asociada a membrana.

Estos autores observan que la activación de macrófagos por el LPS es dependiente de linfocitos B y que estas células son las que producen el factor estimulador, mientras que las células T no son capaces de producir esta estimulación; estos experimentos demuestran que el LPS activa indirectamente al macrófago, estimulando los linfocitos B que son los mediado-

res de esta activación. Otros autores, como ALLISON y cols. (1973), han observado que el LPS -en ausencia de linfocitos B- puede activar macrófagos de cobaya y murinos para producir secreción de distintas enzimas y, por lo tanto, da la impresión de que el LPS puede actuar tanto directa como indirectamente sobre estas células.

CHILLER y cols. (1973) postulan que el LPS actúa como un coadyuvante debido a su efecto mitogénico sobre linfocitos B, que disminuye la cantidad de antígeno necesaria para la estimulación específica de este tipo de linfocitos. Debido a que estos linfocitos son los responsables de la producción del factor estimulador de macrófagos, este efecto coadyuvante podría estar basado en un proceso indirecto via macrófago y, por otra parte, según hemos visto anteriormente, ARMERDING y KATZ (1974) han observado que el LPS también aumenta la función cooperadora de las células T frente al complejo hapteno-proteína. Este efecto pudiera estar mediado por el macrófago que incorpora o se une al antígeno con una mayor eficacia, dando lugar a una activación incrementada de las células T.

Los macrófagos, como ya hemos visto, son necesarios para la iniciación de algunas respuestas inmunes, principalmente aquellas en las que hay cooperación entre linfocitos T y B (FELDMAN y NOSSAL, 1973). De acuerdo con RITTER y cols. (1975) parece que los cultivos mixtos de timocitos, en los que no hay macrófagos, no se estimulan; mientras que en presencia de LPS, estos cultivos, pueden llegar a estimularse, proliferar y diferenciarse en células citotóxicas. En este caso, el LPS puede actuar mediante la activación de los pocos

macrófagos existentes en las suspensiones tímicas ello parece indicar que los macrófagos son el objetivo primario del LPS.

Por último, REED y LUCAS (1975) estudian "in vitro" la citolisis mediada por macrófagos de tumores; durante esta citolisis se liberan al medio citotoxinas solubles inmediatamente después de ponerse en contacto con la célula vulnerable, y la síntesis de estas citotoxinas decae rápidamente hasta desaparecer a las 48 horas. El LPS de E. coli es capaz de hacer recobrar de nuevo la citotoxicidad a estos macrófagos.

5. Correlación entre las actividades mitogénicas,coadyuvantes e inmunogénicas de los lipopolisacáridos endotoxicos.

Como quiera que las actividades, tanto coadyuvantes como mitogénicas de las moléculas de LPS, se atribuyen a la región del lípido A, cabe sugerir que hay una relación funcional entre estas dos actividades; es decir, que el LPS pudiera actuar como coadyuvante porque induce una mitogénesis en las células B.

Por otra parte, el LPS endotóxico es a su vez un potente inmunógeno, debido quizá, a que el antígeno O lleva su propio coadyuvante que actúa también induciendo una mitogénesis en las células B.

Con el fin de poder demostrar esta serie de hipótesis, SKIDMORE y cols. (1975a) han investigado las propiedades coadyuvantes e inmunogénicas de LPS en unas condiciones experimentales en las que estas moléculas no pueden actuar como mitógenos para los linfocitos B, utilizando los siguientes protocolos:

a) con ratones C3H/HeJ en los que el LPS no induce mitogénesis "in vitro"; y b) mediante el empleo de LPS modificados por una hidrólisis y que tienen, por tanto, su actividad mitogénica "in vitro" pero sin afectar la estructura química de la porción antigénica del polisacárido. Estos autores observan que efectivamente parece existir una correlación positiva entre la actividad mitogénica "in vitro" del LPS y su actividad coadyuvante e inmunógena "in vivo". De todas maneras existe gran controversia para admitir que el efecto coadyuvante del LPS ocurre por un proceso cuya base celular esta confinada a las células B antígeno-específicas, sin la participación de células T o de los macrófagos. Asimismo debemos llamar la atención sobre el efecto inhibidor del LPS en la tolerancia producida por inmunoglobulinas humanas en estado de no agregación, no parece ser dependiente de células T.

La inmunogenicidad del LPS también esta en relación con la mitogénesis ya que existen unas diferencias muy marcadas entre los animales de la cepa C3H/St y los C3H/HeJ.

Se ha visto que los ratones C3H/HeJ no son sensibles a los diversos efectos biológicos de los lipopolisacáridos bacterianos. No se activan mitogénicamente ni dan lugar a respuestas policlonales de anticuerpos "in vitro" (ANDERSSON y cols. 1972, COUTINHO y cols. 1975). Este efecto parece ser totalmente específico de la molécula de LPS, puesto que otros mitógenos de células B -tales como el sulfato de dextrano y otros- inducen una respuesta normal en esta cepa.

Recientemente, SKIDMORE y cols. (1975 b) demuestran que la causa de que los C3H/HeJ no respondan mitogénicamente al LPS es debido al método utilizado para extraer el LPS. Los LPS preparados por el método del fenol-agua de McINTIRE y cols. (1967) o por el método del fenol-cloroformo-eter de petróleo de GALANOS y cols. (1969) no son mitogénicos en esta cepa aunque si en la C3H/St; sin embargo, los LPS extraídos por los métodos del fenol-agua de WESTPHAL y JANN (1965) o de MORRISON y LEIVE (1975) dieron alguna estimulación. La preparación mas activa fue la del método de BOIVIN y cols. (1933) y principalmente la del método del butanol-agua de MORRISON y LEIVE (1975).

La estimulación por LPS en estas dos cepas difiere en que la respuesta con C3H/HeJ es menor que la que se obtiene en la otra y alcanza su máximo al segundo día de inoculación, disminuyendo rapidamente, mientras que en C3H/St el día 3 todavía esta en el máximo de actividad estimuladora o cerca de él. El defecto en el C3H/HeJ, que limita sus respuestas mitogénicas frente a ciertas preparaciones, no parece deberse a los linfocitos B.

La etapa inicial de la activación se produce por la unión del LPS a la superficie de las células B, quiza a través de un receptor específico de éste y que es análogo al encontrado en eritrocitos humanos. El LPS que no produce mitogénesis (por estar alterado) es capaz de bloquear la estimulación de las células B por el LPS no alterado. Ambos parece que se incorporan de igual manera, lo que sugiere que los receptores para el LPS alterado no estan en menor número en las células B sino que quiza su estructura también esté modificada y como consecuencia no puede activarlas. En cambio, el LPS no alterado, al unirse a

estos receptores es capaz de modificarlos e inducir a la activación. Estos autores concluyen que las diferencias mitogénicas entre estas dos cepas se deben al funcionamiento de los LPS alterados tanto como a sus receptores que también están modificados; entre los linfocitos B de estas cepas pueden existir algunas peculiaridades de población, por ejemplo:

- a) una sola población de células que responde frente al LPS, con una sola clase de receptor; b) una población única de células B que responda con dos tipos de receptores de LPS; o
- c) dos poblaciones de linfocitos B inmunocompetentes, cada una de las cuales dispone de un tipo distinto de receptor para los dos tipos de LPS. En la Fig. 15 se da una idea de estas tres posibles alternativas.

En cuanto a las posibles diferencias estructurales entre distintos lipopolisacáridos endotóxicos -según su método de extracción- se ha comprobado que dentro del LPS de E. coli K 235 existen diferencias según se obtengan por el método del butanol (MORRISON) o del fenol (McINTIRE). En este último, se utiliza una centrifugación isopícnica en cloruro de cesio para la purificación, se sedimenta en una densidad más alta. El fenol puede denaturalizar el LPS mientras que la extracción con butanol resulta más suave; las diferencias que se aprecian, son debidas seguramente al lípido A.

WOBER y ALAUPOVIC (1971) y BANG y cols. (1974) han sugerido que algunos de los métodos empleados en la extracción del LPS (Tricloroacético, fenol, etc) rompen selectivamente el LPS a altas temperaturas, degradándose no sólo las cadenas específicas O, sino también los ácidos grasos unidos por enlaces éster. CHANG y NOWOTNY (1975), recientemente, han caracteri-

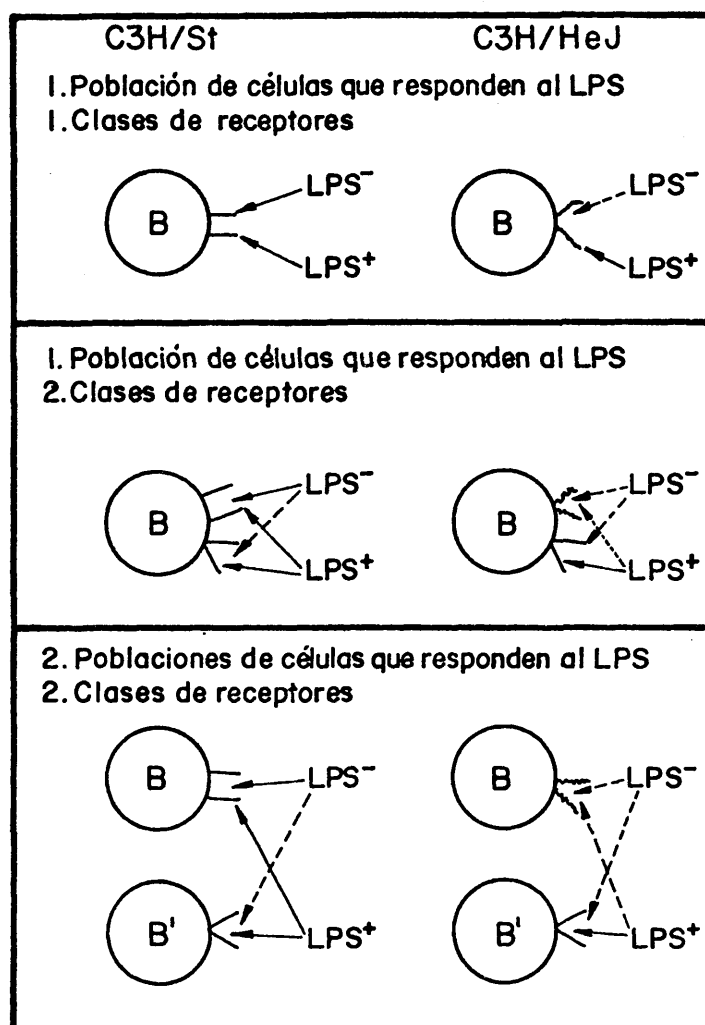


Fig. 15.- Modelos propuestos por SKIDMORE y cols. en relación con la activación mitogenica producida por moléculas de LPS sobre células de bazo de ratones C3H/St y C3H/HeJ según el estado molecular de la endotoxina derivado del método de extracción.

Símbolos: LPS^- , LPS alterado, LPS^+ , no alterado; \longrightarrow , unión de LPS que dá lugar a activación mitogenica; $\cdots\rightarrow$, unión de LPS que no dá lugar a activación mitogenica; \square y \triangleleft , receptores de LPS no alterados; \circ , receptores de LPS alterados.

zando una serie de productos lipídicos que resultan de la hidrólisis ácida de preparaciones de LPS; estas alteraciones estructurales y químicas, pueden afectar por lo tanto las actividades biológicas del LPS. Finalmente, conviene dejar claro que la estimulación de los linfocitos B por el LPS esta en función de la integridad estructural tanto del LPS como de los receptores de membrana

VIII. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Como puede verse, por los capítulos que preceden, investigaciones relacionadas con las moléculas endotoxinas presentan un interés creciente, tanto para estudios biológicos de infecciones microbianas como para escudriñar en la intimidad de los mecanismos moleculares de las respuestas inmunitarias del huésped y sus posibilidades de supresión o, también, para alcanzar un mejor conocimiento de los fenómenos de inducción tumoral y mitogénesis.

Dado lo extenso de la revisión de antecedentes recogida en esta Memoria, parece aconsejable presentar una actualización resumida en apartados que se ocupen separadamente de lo que se refiere a obtención y purificación, estructura y propiedades fisico-químicas y por último de las diversas y variables actividades endotóxicas:

a) En cuanto a localización, extracción y purificación.

En los numerosos datos presentados no parece haber duda alguna sobre la localización de las endotoxinas dentro de las estructuras periféricas bacterianas. Según parece, algunas componentes de su arquitectura macromolecular se sintetizan en la membrana citoplásmica y desde allí, se desplazan por el espacio periplásmico, en forma de LPS hasta la membrana externa; se unen a ella por sus caras externa e interna en-

frentando hacia afuera, por ambas superficies, su porción azucarada y quedando asociada la porción del lípido A con las zonas hidrofóbicas de la membrana. De esta forma, las moléculas endotóxicas quedan localizadas en las caras interna, externa e intermedia de la membrana exterior; con ello se disminuye la permeabilidad frente a los antibióticos y lisozima y también la bacteria, puede defenderse a distancia de actividades líticas producidas por interacciones anticuerpo-complemento; por otra parte, estas moléculas endotóxicas sirven como receptoras de fagos y condicionan su especificidad a determinados azúcares terminales de la molécula del LPS.

Son bastantes y muy variados los métodos seguidos para la extracción y purificación de materiales endotóxicos; en general, en todos se intenta romper la unión del LPS con la membrana externa y su posterior solubilización y precipitación o separación diferencial por tamaños moleculares. Para la extracción se han usado procedimientos más o menos enérgicos, según las especies microbianas o los propósitos particulares del experimentador; así se han empleado, tricloroacético, dietilen-glicol, piridina o fenol; mezclas de fenol-agua, éter-agua o butanol-agua; caotrópicos tales como urea 2,5 M ó dimetil-sulfóxido; agentes quelantes o detergentes catiónicos; o también soluciones salinas de alta fuerza iónica. En el subsiguiente proceso de purificación se pueden utilizar precipitaciones selectivas con etanol, metanol, acetona, polietilenglicol o sulfato amónico; separaciones, según las dimensiones moleculares, por ultracentrifugación, cromatografía o ultrafiltración; y también tratamientos enzimáticos. Como criterios de pureza no aparece ninguna sistemática normalizada y lo único

que parece tenerse en cuenta es que no existan contaminaciones con materiales citoplásmicos y en ocasiones que exista homogeneidad cromatográfica, ya que la homogeneidad electroforética (preconizada por algún autor) es difícil de comprobar dado la variabilidad del comportamiento electroforético de este tipo de moléculas.

b) En cuanto a estructura y propiedades físico-químicas.

Sobre la estructura física de estas moléculas endotóxicas -que ha sido estudiada por microscopía electrónica y ultracentrifugación- se sabe que presentan una muy variada morfología (discos, filamentos, esférulas, etc) dependiendo del método de extracción; su estructura, que está condicionada al agrupamiento micelar de distintas subunidades, se orienta en bicapas, según unos, y en estructuras trilaminares semejantes a la de fosfolípidos, según otros. Las dimensiones varían, en longitud, de 300 - 600 Å para los filamentos largos y de 70 a 50 Å para los cortos; su anchura parece ser de 40 - 50 Å con una zona externa de 15 Å que corresponde a la porción de polisacárido. Este material polidisperso puede disgregarse por detergentes en subunidades más pequeñas que ya carecen de actividad biológica, aunque la recuperan al reagruparse de nuevo. El peso molecular (Pm) de estos lipopolisacáridos se encuentra en el orden de $1,5 \times 10^7$ a 5×10^5 daltons y su coeficiente de sedimentación medio, más frecuente, (s_{20w}^0) varía de 8 a 70 S. Este material polidisperso variable, cuya agregación se discute todavía si tiene carácter hidrofóbico o iónico es bastante heterogéneo y de aquí la gran dificultad de realizar estudios de tamaño molecular.

Químicamente, los lipopolisacáridos endotóxicos son heteropolímeros en los que se distinguen tres regiones diferenciadas: la del antígeno O, con unidades repetitivas de oligosacáridos y agrupamientos químicos específicos, determinantes, del serotipo; una región central, que actúa de núcleo basal y es común para bacterias del mismo género; y la parte lipídica, conocida como lípido A, en la que se asientan la mayoría de las actividades endotóxicas. Las moléculas glucídicas más comúnmente encontradas son glucosamina, heptosa, 3-deoxi-D-manooctulosónico (KDO), galactosa y glucosa (en la parte central).

c) En cuanto a las acciones endotóxicas

Desde nuestro punto de vista, resulta del mayor interés la problemática de las actividades endotóxicas por el gran número de alteraciones y efectos patológicos que producen, dependiendo de la susceptibilidad del huésped y de las particularidades químico-estructurales del lipopolisacárido que se considere. Entre las muchas acciones endotóxicas estudiadas se encuentran las relacionadas con la pirogenicidad; hoy se sabe que la inyección endotóxica produce un cuadro febril en el hombre al cabo de 90-120 minutos (y algo antes en el conejo) que se origina por liberación de un pirogeno endógeno (EP) -glicoproteína de 10.000 - 20.000 d- a partir de granulocitos, que actúa sobre la porción anterior de hipotálamo liberando prostaglandinas de la serie E.

Muy características también, entre las actividades endotóxicas, son las reacciones localizadas y generalizadas de Schwartzman producidas por inhibición de la capacidad fibrinolítica del organismo; en el primer caso, se produce una

coagulación intravascular local con posible intervención de los lisosomas leucocitarios; mientras que en la reacción generalizada se llega a una trombosis glomerulo-capilar que termina en necrosis renal. En ambos casos, posiblemente, el mecanismo bioquímico es una interacción entre proteínas catiónicas-lisosomales y monómeros de fibrina que dan lugar a la formación de coagulos fibrosos. Otras alteraciones vasculares -aunque de distinto signo- son las relativas a trastornos de la permeabilidad vascular, producidas por activación de la adeníl-ciclasa y que, en ocasiones, pueden llegar a originar necrosis tumorales hemorrágicas o lesiones de placenta.

En relación con las alteraciones hematológicas producidas por las endotoxinas, se sabe que éstas son muy variadas, ya que además del shock endotóxico producido, posiblemente, por interacción del LPS con receptores específicos existentes en los eritrocitos, se pueden producir: una acusada ferropenia en suero, leucopenia, leucocitosis con granulocitosis secundaria, trombocitopenia y alteraciones de la coagulación; éstas dos últimas, como consecuencia de interacciones entre el lípido A del LPS y receptores específicos de las plaquetas o por liberación de activadores del plasminógeno y de enzimas lisosómicas, respectivamente. Es curioso, sin embargo, que alguno de estos efectos cuando se producen a menor concentración puedan ser responsables de la resistencia inespecífica -frente a infecciones microbianas- que produce el tratamiento con endotoxinas. Principales causas de estos incrementos de resistencia antiinfecciosa son la activación de macrófagos y del sistema reticulo-endotelial con cuadros de granulocitosis, cambios vasculares y disminución del metabolismo del Fe.

Hace pocos años se han descubierto unas actividades biológicas de los LPS enterotóxicos que tienen un gran interés, éstas son las acciones antitumorales frente a linfosarcomas, linfomas y tumores ascíticos esta acción parece relacionada con variaciones en el nivel de AMP cíclico y, en cuanto a dosis, con la actividad mitogenética desarrollada sobre los linfocitos B. Aunque no se conoce el mecanismo íntimo del fenómeno se sabe que el lípido A es capaz de inhibir la incorporación de precursores del DNA y de actuar sinérgicamente con la fitohemaglutinina en la mitogénesis de timocitos.

Otro efecto sorprendente del lípido A de los LPS es su capacidad de inducir -en cultivos celulares de ratón- virus endógenos del tipo C (con LPS sólo) o del tipo T (cuando se asocia LPS con bromodeoxiuridina); estos virus son capaces de inducir tumores, principalmente, en células del sistema linforeticular. También son de destacar, en estas interacciones endotoxina-virus, la producción de interferones inespecíficos que en ocasiones no son inhibidos por inhibidores de síntesis proteica ni del mRNA; ello hace pensar que el LPS produce, mas que una verdadera síntesis de interferón, la liberación de un pre-interferón ya formado. Las diferencias que existen entre los distintos interferones pueden estar condicionadas por variaciones en el grado de polimerización del LPS inductor o por su diversificación estructural.

Asimismo, entre la variada fenomenología que se observa en el shock endotóxico, aparecen algunos cambios metabólicos y endocrinos que se reflejan en alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, como son una acentuada hiperglucemia posiblemente por movilización masiva del glucógeno seguida de una

grave hipoglucemia. El fenómeno quizá se efectúa sobre un mediador de la gluconeogenesis y como resultado de una inhibición del metabolismo oxidativo mitocondrial, a nivel de membrana, por quelación del Mg^{++} endógeno o por modificación en los niveles de cAMP, o de prostaglandinas.

d) En cuanto a las interacciones endotóxicas con el sistema inmunitario y propiedades mitogénicas.

Las interacciones de los LPS endotóxicos con el sistema inmunitario son de una gran versatilidad, dependiendo de las características fisico-químicas del LPS, de la dosis y pauta de administración y de la modalidad de reacción del huesped. Así, después de un detenido examen de la bibliografía correspondiente, se puede comprobar que los LPS endotóxicos pueden actuar como potentes inmunógenos en casi todas las variedades de ratón, produciendo en la mayoría de los casos IgM y en algunas ocasiones IgM e IgG por especial estimulación de los linfocitos B (mediante el lípido A y por respuesta policlonal) u ocasionalmente estimulando una cooperación de las células T. Esta inmunogenicidad puede variar con la temperatura, disminuyendo en un 95% cuando se calienta el LPS y recuperándose el efecto por congelación y descongelación. Asimismo, estas moléculas endotóxicas pueden funcionar como inmuno-coadyuvantes -mediante estímulos inespecíficos de la división celular- sobre células que han sido previamente diferenciadas inmunológicamente por un primer estímulo antigénico y -en fenómenos de hipersensibilidad retardada- pueden modificar la producción de IgE. Todas estas reacciones están condicionadas al momento y modalidad de administración de la endotoxina, según que se inyecte o no simultáneamente con el hapteno; cuando el LPS se inyecta des-

pues que el antígeno se incrementa la respuesta inmunocelular, mientras que si se administra antes el LPS que el antígeno se aumenta la producción de IgM pero se disminuyen las reacciones de hipersensibilidad retardada. Un caso particular del comportamiento del los LPS en las reacciones inmunitarias es la activación ejercida sobre el sistema complemento; no se está totalmente seguro si esta activación se realiza por la vía clásica -en la que intervienen 18 proteínas o factores séricos- o es a través del sistema properdina, que es una vía alternativa que no precisa de todos los factores del complemento.

Las endotoxinas, por su carácter de antígeno timo-independientes, son capaces de inducir tolerancia inmunológica a dosis elevadas en las que probablemente intervengan timocitos supresores. Es curioso el hecho, sin embargo, de que esta acción pueda ser revertida en determinadas circunstancias, quizá por un efecto mitogénico subsiguiente. En cuanto al fenómeno de inmunosupresión ("tolerancia irreversible"), se tienen detalles de que puede estar basado en un efecto linfotóxico o de competición antigénica timoindependiente, en el que se libera una sustancia inhibidora inespecífica a nivel de la superficie del macrófago. Esta acción inmunosupresora de los LPS se está utilizando como "herramienta inmunológica" para desentrañar los mecanismos íntimos de la respuesta inmune y de las posibles relaciones existentes entre inmuno-respuesta y síntesis de interferón.

Finalmente, entre las actividades biológicas mas recientemente descritas y cuyo estudio es de enorme actualidad, se encuentran las acciones mitogénicas de los LPS que, según unos, afecta a las células B y según otros puede incluir tanto a las células B como a las T -según el sistema biológico y métodos experimentales utilizados- pero en general, se observa

gran controversia dentro de la interpretación de datos. El incremento de la síntesis de DNA inducida por los LPS en células B va precedida de incrementos en la incorporación de aminoácidos y con intervención de variaciones en los niveles de nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP); éste último, quizá sirva de señal mitogénica para inducir al proceso proliferativo de los linfocitos. Lo que sí parece cierto es que el fenómeno de mitogénesis se puede usar como modelo para estudiar el mecanismo de inducción de células inmunocompetentes y que está relacionado con las actividades coadyuvante e inmunogénica de la molécula; pudiéndose afirmar que, en general, esta mitogénesis está condicionada a la integridad estructural del LPS y de los receptores de membrana en los linfocitos, existiendo diferencias que se deben a los diferentes métodos de extracción y purificación que proporcionan materiales endotóxicos con diferencias químico-estructurales y distinta proporción del lípido A.

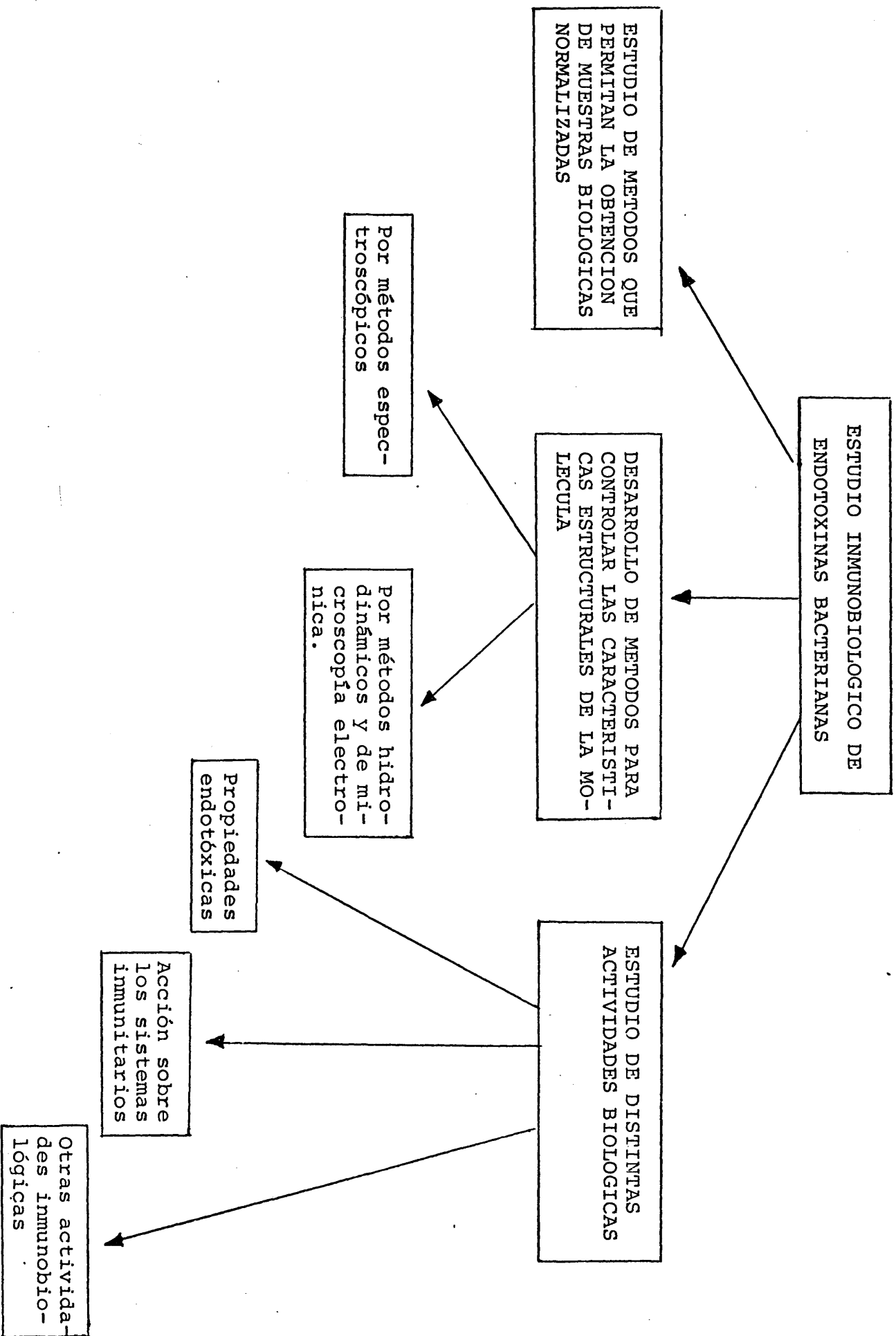
PARTE
EXPERIMENTAL

I. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Después de revisar los antecedentes del tema y comprobar que, pese al gran número de trabajos realizados, existen algunos interrogantes e incluso controversia en muchos aspectos del conocimiento e interpretación del papel biológico de las endotoxinas bacterianas, creemos necesario aportar nuevos datos al estudio de estos lipopolisacáridos; sobre todo en la normalización de técnicas que posibiliten las investigaciones comparativas y el conocimiento de sus propiedades inmunobiológicas.

Dado el interés creciente de las infecciones por *Pseudomonas* y que las endotoxinas de estas especies son, quizá, de las menos ampliamente estudiadas, parece necesario un más completo estudio, tanto a nivel de obtención y purificación - para conseguir materiales de estructura homogénea y comparable- como en alguno de sus aspectos inmunobiológicos -para completar las investigaciones sobre su actividad biológica- comparandola con la de moléculas semejantes obtenidas a partir de otras bacterias Gram-negativas.

Con este propósito, nuestras actividades experimentales podrían esquematizarse del modo que se indica a continuación:



II. MATERIAL Y METODOS

1. Material y medios

1.1. Microorganismos.

En este estudio se han utilizado estirpes de Pseudomonas aeruginosa (aisladas de tumores humanos), de Escherichia coli (aislados del tracto gastrointestinal de enfermos entéricos), así como de Salmonella typhi, Brucella abortus, Brucella melitensis y Yersinia enterocolitica, procedentes de distintas muestras clínicas, y Micrococcus lysodeikticus para valorar sistemas enzima -antienzima en ensayos de inmunosupresión.

Asimismo se han utilizado, para estudios de relaciones endotoxina-interferón, virus de la enfermedad de New Castle, cepa de Italia y virus de la estomatitis vesicular (VSV), cepa Indiana C.

1.2. Lineas tumorales

Se han utilizado células de un mastocitoma p815y específico de ratones DBA/2 (DUNN y POTTER, 1957).

1.137 Animales de experimentación

Ellos fueron utilizados, unas veces para realizar las correspondientes pruebas biológicas de ensayo en animales y otras para obtener las distintas células, anteriormente mencionadas.

Se han utilizado ratones machos suizos no consanguíneos Ham/ ICR, así como ratones consanguíneos DBA/2 (H-2^d), todos ellos de Charles River (PanLab).

Los conejos utilizados para las experiencias inmunológicas eran grises, y albinos para las determinaciones de pirogenicidad; todos ellos de unos 2,5 - 3 Kg de peso.

Por otra parte, para los estudios de producción de interferón se han utilizado pollos blancos Leghorn de 1 mes de edad y 120 - 170 gr de peso.

1.4-Medios de cultivo.

En este trabajo se utilizaron diversos medios de cultivo, en función del propósito experimental y de la estirpe bacteriana. Así, además de los medios habituales de identificación bacteriana utilizados en algunos casos para control de los microorganismos utilizamos también:

1.4.1 - Caldo Penassay a pH 7. Para el cultivo de P. aeruginosa, compuesto por: 1,5 gr de Extracto de carne; 1,5 gr de Extracto de levadura; 5 gr de Peptona; 1 gr de glucosa; 3,5 gr de cloruro sódico y 1,32 gr de fosfato dipotásico, llevado hasta un litro con agua destilada. En algunos casos se utiliza sin glucosa. Se esteriliza a 110°C en autoclave.

1.4.2. - Caldo común pH 7,2. Para el cultivo de Yersinia enterocolítica. Contiene 3 gr de Extracto de carne; 10 gr de Peptona; 5 gr de cloruro sódico, llevado a un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 120°C

1.4.3. - Caldo de soja con triptona pH 7,3. Para el cultivo de B. melitensis y B. abortus. Compuesto por: 17 gr de triptona; 3 gr de peptona de soja; 2,5 gr de glucosa; 5 gr de cloruro sódico y 2,5 gr de fosfato dipotásico, llevado a un litro con agua destilada y se esteriliza a 110° C.

1.4.4. - Medio para Salmonella (GMEINER y cols, 1969). Compuesto por 15 gr de hidrolizado de caseína; 5 gr de extracto de levadura; 3 gr de cloruro sódico; 2 gr de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; y 0.2 gr de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, y 10 gr de glucosa, llevado a un litro con agua destilada. Esterilizado en autoclave a 120°C. Los dos últimos compuestos se esterilizan por separado a 110° C.

1.4.5. - Medio L, pH 7,2. Para el cultivo de E. coli. Compuesto por 10 gr de triptona; 1 gr de extracto de levadura; 8 gr de cloruro sódico y 2 gr de glucosa, llevado a un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 120° C, la glucosa se esteriliza por separado a 110°C.

1.4.6. - Medio mínimo de sales C, pH 6,7. Compuesto por 2 gr de Cloruro amonico; 6 gr. de fosfato disódico; 3 gr de fosfato potásico; 3 gr de cloruro sódico; 10 mg de cloruro de magnesio y 25 mg de sulfato disódico, llevado a un litro con agua destilada. Se esteriliza a 120° C, el cloruro amónico y el magnésico por separado y a 110° C.

1.4.7. - Medios para cultivo de células de mamífero

El medio básico utilizado es el RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, N.Y., Quimigranel, S.A.), cuya composición para un litro aparece detallada a continuación: 100 mg $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$. $4 \text{H}_2\text{O}$; 2000 mg de glucosa; 100 mg de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 400 mg ClK; 1512 mg de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6000 mg ClNa; 200 mg de L-arginina; 50 mg de L-asparagina; 20 mg de Acido L-aspartico; 50 mg de L-cistina; 20 mg de Acido L-glutámico; 300 mg de L-glutamina; 1 mg de glutation (reducido); 10 mg glicocola; 15 mg de L-histidina; 20 mg de L-hidroxiprolina; 50 mg L-isoleucina; 50 mg de L-leucina (libre de metionina); 40 mg de L-lisina ClH; 15 mg de L-metionina; 15 mg de L-fenilalanina; 20 mg de L-prolina (libre de hidroxil-L-prolina); 30 mg de L-serina; 20 mg de L-treonina; 5 mg de L-triptofano; 20 mg de L-tirosina; 20 mg de L-valina; 0.2 mg de biotina; 0.005 mg de vitamina B_{12} ; 0.25 mg de D-pantotenato Ca; 3 mg de Cl-Colina; 1 mg de ácido fólico; 35 mg de i-inositol; 1 mg de nicotinamida; 1 mg de ácido para-amino-benzoico; 1 mg de piridoxina-ClH; 0.2 mg riboflavina; 1 mg de tiamina ClH; 5 mg de rojo fenol y 2000 mg de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}$.

A este medio se le añade, un día antes de ser utilizado, L-glutamina (concentración final $2 \times 10^{-3} \text{ M}$), penicilina (concentración final 100 unidades/ml) y 2-mercaptoetanol (concentración final $3 \times 10^{-5} \text{ M}$). El medio de cultivo lleva además un 10% de suero fetal de ternera previamente inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Cuando este medio ha de usarse para lavado de células se le añade solamente 5% de suero fetal de ternera inactivado y no lleva 2-mercaptoetanol. El medio para congelar células, es básicamente el mismo, con la excepción de llevar 20% de suero fetal de carnero inactivado y dimetil sulfoxido al 10%.

El medio stock y el suero fetal de ternera se esteriliza por filtración a través de filtros EKA o Millipore (0.22 μ) y se guarda en alicuotas a -20° C. El antibiótico así como la glutamina se esteriliza de igual forma guardándolo congelado en pequeñas alicuotas.

1.4.8. Medios para cultivo de fibroblastos de embrión de pollo.

Se utilizaron los tres medios que se indican a continuación:

1.4.8.1. Medio de crecimiento

Se preparan 100 ml de medio con: 90 ml de solución de Hank (con glucosa); 4 ml de solución de hidrolizado de lactoalbúmina (al 5% en Hank); 5 ml de suero de ternera; 100 U.I./ml de penicilina; 100 μ g/ml de estreptomycin; 20 U.I./ml de nistatina, 0,2 ml de extracto de levadura (al 0.1%) y 1 ml de rojo fenol (al 0.2%).

1.4.8.2. Medio de mantenimiento

Se preparan 100 ml de medio con: 85 ml de solución de Hank (con glucosa); 10 ml de solución de hidrolizado de lactoalbúmina (al 0.5%); 100 U.I./ml de penicilina; 10 μ g/ml de estreptomycin; 20 U.I./ml de nistatina; 0.2 ml extracto de levadura (al 0.2%) y 1 ml de rojo fenol (al 0.4%)

1.4.8.3. Medio de recubrimiento con Bactoagar

A 50 ml de la solución de agar al 1,8%, a una temperatura de 42° C, se añaden 25 ml de medio de crecimiento doblemente concentrado previamente calentado a 37° C; una vez mezclado, se añaden 25 ml de la solución de rojo neutro (0.4 mg/ml) en solución de Gey sin bicarbonato sódico.

Un litro de solución salina de Gey (GEY y COFFMAN, 1952) contiene: 8 gr de ClNa ; 0.379 gr de ClK ; 0.127 gr de Cl_2Ca ; 0.203 gr de $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.625 gr de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ y 0.025 gr de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$.

1.5. Reactivos químicos

Además de las sustancias componentes de los anteriores medios de cultivo utilizamos distintos reactivos especiales. Así, para concentrar soluciones usamos Carbowax (polietilén glicol 6000) de Serva; y como reactivos especiales en cromatografía, dextrano azul 2000 (de Pharmacia Fine Chemicals) y DEAE-dextrano (también de Pharmacia) fueron asimismo utilizados.

1-Etil-2-[3-(1-etil-naftol (1,2d)-tiazolin-2-ylidina)-2-metilpropenil] nafto (1,2d)-bromuro de tiazolio (Eastman Organic Chemical) fue empleado para preparar el reactivo espectro-colorimétrico de JANDA y WORK.

Glucosamina-6- ^3H (The radiochemical Centre, Amersham), $^{51}\text{Cr} \text{O}_4\text{Na}_2$ (JEN), metil- ^3H -Timidina (Amersham).

Los geles de cromatografía, Sepharosa 4B, 2B, Sephadex G200 y G50 son de Pharmacia Fine Chemicals; las membranas de ultrafiltración XM-100A de Amicon. Los demás reactivos son de Merck (de grado analítico).

1.6. Reactivos biológicos y otros reactivos. Entre esta clase de reactivos destacan:

1.6.1. Antibióticos y antiinflamatorios

Penicilina (Antibióticos, S.A.), Rifampicina, Rifamicina SV y AF/O-13 (Lepetit) e indometacina (Merck) se utilizaron para distintos ensayos con virus e inmunosupresión, respectivamente.

1.6.2. Mitógenos

Fitohemaglutinina (PHA-P de Difco); Concanavalina A (Calbiochem), sulfato de dextrano (Pharmacia Fine Chemicals).

1.6.3. Enzimas

Deoxiribonucleasa I (Worthington Biochemical Corporation) y Ribonucleasa de pancreas bovino (BDH Biochemicals).

1.6.4. Otros

Suero fetal de ternera (Difco), eritrocitos de carnero (Ibys), complemento de cobaya fresco (Ibys). También hemos de citar en este apartado el PYROGENT (TM) de los laboratorios Mallinckrodt, compuesto por lisados de amebocitos circulantes de Limulus polyphemus, y que utilizamos para algunos ensayos de pirogenicidad comparativa. Macaloid (Baroid Div. Nat. Leal. Co. Houston, Texas) fue usado para extracción de RNA.

1.7 - Material de plástico y cristal para cultivos celulares.

Se han utilizado para preparar suspensiones celulares, cultivos, etc, tubos, frascos y placas petri de plástico, todos ellos estériles y desechables.

- Placas petri para preparar suspensiones celulares de 60 x 13 mm (Sterilin n°303S) y 90 x 13 (Labclinics/CAP/90).

- Tubos de polipropileno (5 ml) para cultivos de 75x13mm y fondo redondo (Labclinics n°cat. TH75.13 ST).

- Frascos de fondo plano de 35x70mm (Labclinics n°cat. FP35.70VST) de 60 ml.

- Tubos centrifuga de 25x90mm de fondo cónico (Labclinics n°cat. FP- 25.90VST)

El material de vidrio se lava con detergente, hirviéndolo después en metasilicato y luego con agua destilada. Este material se esteriliza en autoclave a 110° C.

2. Técnicas

Dado la diversidad de técnicas utilizadas en esta Memoria parece aconsejable agruparlas de acuerdo con su naturaleza distinguiendo entre métodos microbiológicos, químicos inmunológicos, etc.

2.1. Metodos microbiológicos

Entre ellos es preciso destacar, preferentemente los que siguen:

2.1.1. Cultivo de bacterias

Aquí indicaremos que las especies Brucella abortus y Brucella melitensis fueron cultivadas en sus variantes lisas sobre matraces conteniendo 500 ml de caldo de soja-triptona. Cada matraz se inoculó con aproximadamente 10^9 células, incubándose a continuación durante 36 horas a 37° C en un incubador metabólico rotatorio NBC. Después las bacterias se recogieron por sedimentación en una centrífuga refrigerada Beckman J-218 a 7000 g durante 15 minutos o en una Sharples de flujo continuo. Las cosechas bacterianas se lavaron dos veces en tampón fosfato salino estéril (PBS, 8 gr ClNa, 0.2 gr ClK, 2,8 gr $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y 0.2 gr de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ llevado a un litro con agua destilada, pH 7,3) y una vez mas en agua destilada y finalmente se liofilizan mediante un liofilizador Virtis.

La Yersinia enterocolitica fué cultivada a 26° C en caldo común a un pH inicial de 7,2, en matraces de 2 litros conteniendo 500 ml de medio y con agitación. Las bacterias se recogieron durante la fase estacionaria temprana, por centrifugación en una Beckman J218 a 7000xg durante 15 minutos o en una Sharples de flujo continuo, se lavaron en tampón fosfato salino esteril y se liofilizaron posteriormente.

Escherichia coli se cultivó a 37° C (en matraces de 2 litros) con 1 litro del medio L de LENNOX (1955) y en un incubador con agitación. Se inocularon los matraces con 10 ml de un cultivo en fase estacionaria y se recogieron las bacterias al comenzar la fase estacionaria de su curva de crecimiento, de la misma manera que en los anteriores cultivos.

Salmonella typhi se cultivó en el medio descrito por GMEINER y cols. (1969) a 37°C, con agitación, y se cosecharon las células en una forma similar a los casos anteriores.

Pseudomonas aeruginosa se cultivó en matraces de dos litros con 1 litro de medio Penassay (sin glucosa), inoculando con 10 ml de un preinóculo en fase estacionaria y manteniéndolos en agitación a 37° C hasta el principio de la fase estacionaria (unas 6 horas y media de cultivo). Las células se deshidratan según el método de MACKIE y McCARTNEY (1960): se lavan dos veces en tampón fosfato salino estéril (7000 xg durante 15 minutos), se resuspende el sedimento de cada litro de cultivo en 2 volúmenes de agua fría, añadiendo a continuación 5 volúmenes de acetona (a - 20° C) y se dejan sedimentar durante 1 hora.

Se elimina el sobrenadante por centrifugación a 5000 xg durante 10 minutos; se lava nuevamente con unos 5 volúmenes de acetona y se filtra sobre papel de filtro en un soporte millipore. Seguidamente se lava con éter dietílico, dejando secar en vacío con cloruro cálcico y se almacena a 4° C en nevera. Todos los pasos que transcurren desde la recogida de las bacterias hasta su deshidratación se llevan a cabo a temperaturas inferiores a 4° C. Este procedimiento de desecación se utilizó indistintamente con la liofilización. Excepto en el caso de E. coli y P. aeruginosa, las bacterias, antes de sedimentarlas, fueron sometidas a un tratamiento con formalina al 1% o con fenol al 0.25%, manteniéndolas durante 2 horas a 0° C para su total inactivación.

2.1.2. Obtención de virus

El virus de la enfermedad de New Castle (NDV) se obtuvo fresco, inyectando embriones de pollo de 10 días con 10^3 veces la DL50 del huevo en el saco alantoideo. El fluido alantoideo se recogió a las 36-48 horas después de la infección.

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) se obtuvo de fibroblastos de embriones de pollo infectados con VSV dando lugar a títulos de 10^8 unidades formadoras de placas por ml.

2.2. Metodos Bioquímicos

Estos fueron utilizados para la obtención y purificación de los distintos materiales biológicos base de este estudio.

2.2.1. Obtención de lipopolisacáridos

Los LPS de P.aeruginosa, E. coli y S. typhi se obtuvieron según el procedimiento de WESTPHAL y JANN (1965). Para ello, unos 6 gr (peso seco) de bacterias se resuspendieron en 100 ml de agua a 65-68°C y se añade un volumen igual de fenol al 90%; la mezcla se agita vigorosamente durante 15 minutos a 65° C. Después de enfriar dicha mezcla hasta, aproximadamente 10° C metiendo el matraz en hielo, se centrifuga a 2000xg durante 30 minutos, (a 4° C) obteniéndose la formación de tres capas: una capa acuosa que contiene LPS y ácidos nucleicos, una capa intermedia fenólica conteniendo proteínas y LPS en algunos casos y, por último, una capa inferior de restos celulares y proteínas desnaturalizadas. Entre la capa fenólica y la acuosa se puede formar un residuo insoluble.

Se retira con pipeta Pasteur la fase acuosa, y las capas restantes se reextraen una vez más con 100 ml de agua a 65° C en idénticas condiciones. Ambas fases acuosas se mezclan y se dializan, a continuación, durante 48 horas frente a frecuentes cambios de agua desionizada para eliminar el fenol; esta operación se realiza a 4° C en cámara fría. El dializado, algo opaco, se centrifuga con el fin de eliminar el material insoluble; mas tarde esta solución se liofiliza y de ella se obtiene el LPS crudo.

Las endotoxinas de B. abortus, B. melitensis y Y. enterocolítica se obtuvieron según REDFEARN (1960), BAKER y WILSON (1965) y LEONG y cols. (1970). La extracción se hizo de igual forma que las anteriores, pero esta vez obteniéndola a partir de la fase fenólica. En la figura 16 aparece el procedimiento utilizado.

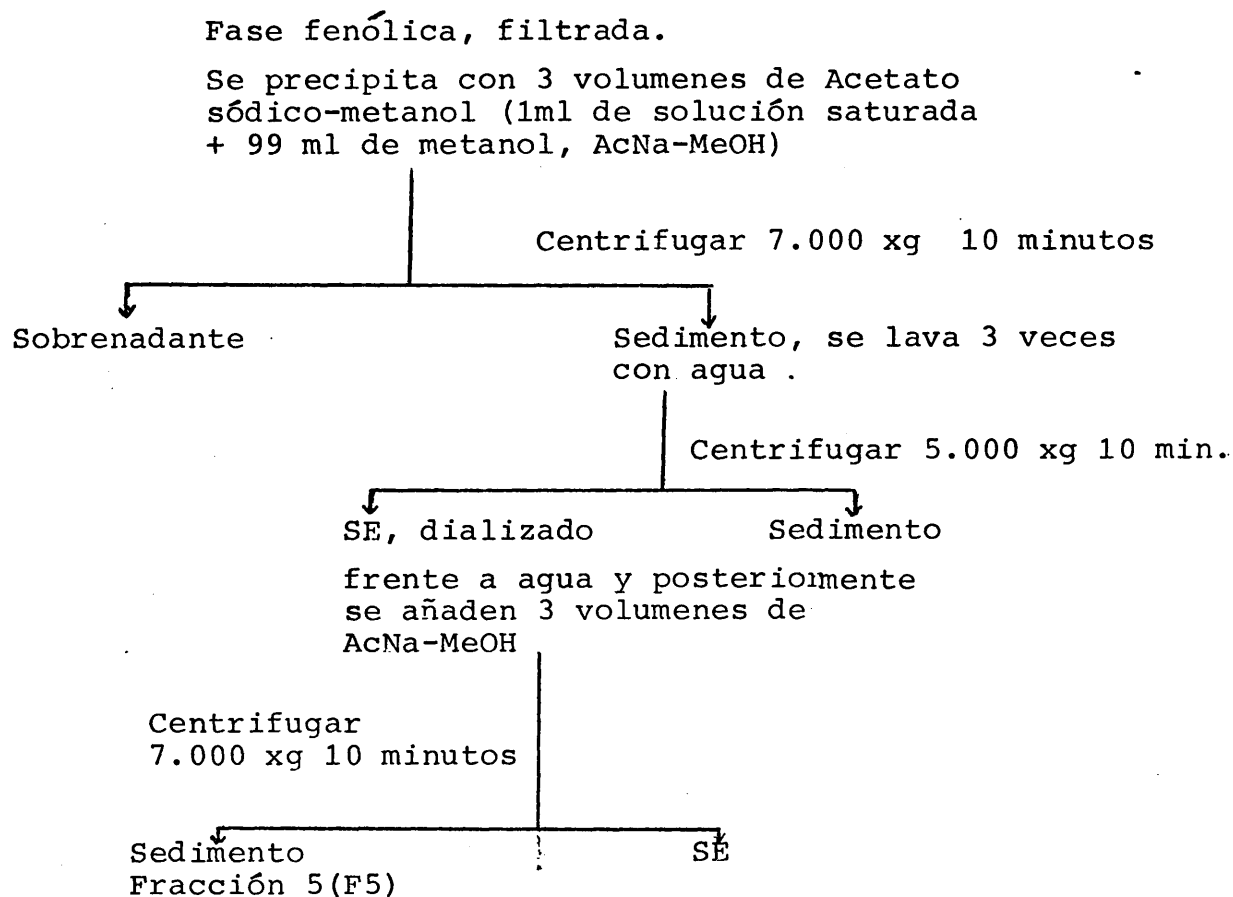


Fig. 16.- Procedimiento de extracción del LPS de B. abortus
B. melitensis y Y. enterocolitica por el método del
fenol-agua según REDFEARN

El lipopolisacárido de P. aeruginosa, se obtuvo también por otro procedimiento según ROGERS y cols. (1969), mediante su extracción a partir de paredes celulares con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las paredes celulares se aislaron según BOBO y EAGON (1967). A un volumen de 40 ml de células sedimentadas se le añaden 60 ml de tampón 0.1 M a pH 5.5 y se rompen en un fraccionador refrigerado de RIBI-Sorvall modelo RF-1 a una presión de 1.120 Kg/cm². El material disgregado se centrifuga a 14.000 xg durante 20 minutos. El sedimento se resuspende en 50 ml de tampón fosfato 0.1 M pH 5,5 y se centrifuga a 14.000 x g durante 20 minutos; este nuevo sedimento obtenido, consistente en paredes celulares, se lava 2 veces en tampón fosfato y 5 veces en agua destilada antes de liofilizarle. En este caso también todas las centrifugaciones tuvieron lugar de 0 - 4 ° C.

Las paredes celulares aisladas se incubaron a 25° C, durante 30 minutos y con agitación, en tampón Tris-ClH 33mM (pH 8) y EDTA 1 mM para una concentración de paredes de 1.5 mg/ml. Después de incubar, se centrifugó a 37.000 xg durante 60 minutos a 0° C y se eliminó el sedimento. El sobrenadante, conteniendo el LPS, fué filtrado a través de membranas Millipore (0.45 μ), y concentrado por destilación a baja presión en rotavapor a 42° C; después, se dializó frente a tampón Tris-ClH 33 mM (pH 8) a 4° C durante 72 - 96 horas y seguidamente, se dializó de nuevo frente a varios cambios de agua destilada durante 48 horas. Finalmente se concentró frente a Carbowax 6000 (polietilenglicol al 10%), a 4° C, liofilizándolo a continuación.

2.2.2. Purificación de lipopolisacáridos

Las endotoxinas extraídas de la fase acuosa, según el método de WESTPHAL, se sometieron a tratamiento enzimático con nucleasas, seguido de centrifugación, cromatografía en Sepharosa 4B, 2B o ultrafiltración en membranas Diaflo XM100.

Las fracciones F5 de la fase fenólica del lipopolisacárido de B. abortus, B. melitensis, Y. enterocolitica se sometieron a cromatografía en Sepharosa 4B, mientras que con el de P. aeruginosa -obtenido por el procedimiento de ROGERS- se utilizó la cromatografía en Sepharosa 4B y 2B o la ultrafiltración, sin tratamiento enzimático previo.

El tratamiento enzimático consiste en disolver el lipopolisacárido crudo -a una concentración de 5 mg/ml- en Tris-ClH 0.05 M a pH 7 añadir ribonucleasa a una concentración final de 300 μ g/ml e incubar a 37° C durante 16 horas. A continuación, se añade deoxiribonucleasa a una concentración final de 20 μ g/ml y con 20 mM de Mg^{++} en forma de sulfato. Después se continua la purificación por sedimentación, ultracentrifugación o separación cromatográfica.

2.2.2.1. Sedimentación en ultracentrífuga

Para ello se siguió el método de WESTPHAL y JANN (1965) con algunas modificaciones, ya que estos autores no tratan con nucleasas. Primeramente clarificamos por centrifugación a 2.500 x g durante 20 minutos el LPS crudo digerido. Después se centrifugó a 105.000 xg durante 4 horas a 0° C (Beckman L3-50). El sedimento fué centrifugado nuevamente en

agua a 105.000 xg durante 4 horas y repitiendo una vez más el proceso. Finalmente el sedimento obtenido fué resuspendido en agua y liofilizado.

2.2.2.2. Ultrafiltración

Para éste método de purificación hemos utilizado membranas Diaflo XM-100 A, que retienen partículas de peso molecular superior a 100.000 d y una célula de ultrafiltración Amicon (modelo 52). El extracto digerido por enzimas, previamente obtenido, fué purificado por filtración continua o discontinua, según los casos. La filtración discontinua consiste en una dilución previa, hasta alcanzar el volumen de 50 ml, que va seguida de una concentración hasta 10 ml y repitiendo el proceso del orden de 5 veces. En estas condiciones se cumple la relación:

$$C_f = \left(\frac{V_i}{V_d} \right)^n \times C_i ,$$

donde C_f = Concentración final de contaminantes menores de 100.000 d.

C_i = Concentración inicial del contaminante

V_i = Volumen inicial de la muestra

V_d = Volumen después de la dilución

Si $V_i = 10$ ml y $V_d = 50$ ml

$$D_f = \frac{1}{5^5} = \frac{1}{3.125} \times C_i, \text{ o sea que el factor teórico}$$

de lavado es aproximadamente 3×10^3 veces.

Con la filtración continua el ahorro de tiempo es mayor. La célula se conecta a un depósito con tampón, se mantiene constante el volumen de la muestra y la filtración se continúa hasta no detectar absorción a 260 nm en el eluido.

En este caso cumple la relación:

$$\ln \frac{C_i}{C_f} = \frac{V_f}{V_i}$$

V_f = volumen de solución de lavado que atraviesa la célula de ultrafiltración

Si $V_i = 10$ ml, y $V_f = 80$ ml el factor teórico de lavado es, como anteriormente, de unas 3×10^3 veces. En este caso sólo se necesitan 80 ml para una buena eliminación de material contaminante, mientras que en la filtración discontinua el volumen necesario para ello es de aproximadamente 200 ml.

La presión utilizada es de 0.8 Kg/cm^2 y el tampón es Tris-ClH 0.05 M a pH 7, continuando al final con agua destilada.

2.2.2.3. Cromatografía en Sepharosa 4B y 2B

Se utiliza una columna de 40 cm de altura y 2,5 cm de diámetro. El flujo es de unos 30 ml/hora y la presión de trabajo es de 50 cm de columna de agua. El tampón de elución es Tris-ClH 0.02 M, ClNa 0.1 M pH 7.6. El volumen de exclusión de la columna (V_o) fué determinado con azul de dextrano y el volumen de inclusión (V_i) se obtuvo aproximadamente, mediante la elución de triptofano.

El volumen total de la columna es de 192 ml, el V_0 es de 54 ml y el V_i es de 135 ml.

Los eluidos de la columna se pasaron a través de un monitor de absorbancias ISCO (modelo UA-4) leyendo a una densidad óptica de 254 nm y las fracciones fueron recogidas en un colector Buchler Fractometer a razón de 9 ml por tubo. El contenido total en carbohidratos, se determinó según el ensayo del fenol-ácido sulfúrico de DUBOIS y cols. (1956). Este ensayo se hace de la siguiente forma: A 1 ml de solución de azúcar, conteniendo entre 5 μ g y 30 μ g de glúcido, se le añaden 25 μ l de fenol al 80%. Entonces se añaden rápidamente 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado añadiéndolos directamente sobre la superficie del líquido para obtener una mezcla mas completa. Se dejan los tubos durante 10 minutos a 20° C en un baño de agua a 25° C antes de hacer las lecturas. El color es estable durante varias horas. Se mide la absorción a 490 nm (para determinar hexosas). La cantidad de azúcar se determina por comparación con una curva de calibración establecida a base de glucosa.

2.2.3. Obtención de endotoxinas radi activas

Para este propósito, se siguieron esencialmente dos procedimientos de marcado, uno de ellos fue efectuado "in vivo" mediante incorporación de glucosamina-6-³H, y el otro "in vitro" con ⁵¹Cr O₄Na₂.

En el primer caso se utilizó el procedimiento de BARA y cols. (1973) con algunas modificaciones. Las bacterias -P. aeruginosa- se cultivaron en Penassay (sin glucosa) a 37° C

con agitación y se recogieron al final de la fase logarítmica, lavándose a continuación con medio C (sintético de sales) descrito por TREMBLAY y cols. (1969). A un volumen de unos 4 ml de bacterias sedimentadas, se le añaden 30 ml de medio C suplementado con una concentración final de fructosa de 10 mg/ml y 100 μ Ci de D-glucosamina-6-³H (actividad específica 12,6 Ci/mmol), para dejar esta suspensión incubando durante 30 minutos a 37° C y con agitación. Las células se lavaron en tampón fosfato salino pH 7,2 tres veces; a continuación, se procedió a la extracción del LPS de la fase acuosa según el método del fenol-agua, purificándolo por ultrafiltración y previa digestión enzimática. Las medidas de radiactividad se realizaron en un espectrofotómetro de centelleo líquido Intertech-nique mod. SL32, disolviendo la muestra en líquido de centelleo Ready Solve (Beckman).

El marcado con cromato disódico (⁵¹CrO₄Na₂) se realizó de acuerdo con el procedimiento de BRAUDE y cols. (1955), posteriormente también utilizado por LEONG y cols. (1968). Este método consiste en suspender la endotoxina en tampón fosfato salino pH 7 estéril a una concentración de 5 mg/ml; a este líquido se le añade 70 μ Ci de ⁵¹CrO₄Na₂ por ml de solución (actividad específica 140 mCi/mg de Cr). La mezcla se mantiene incubando con agitación a 37° C durante 24 horas para, después, dializar la endotoxina marcada frente a frecuentes cambios de agua destilada, con el fin de eliminar el ⁵¹Cr no ligado a la molécula endotóxica. Cuando ya no se detectaba radiactividad en el dializado, se congela la endotoxina en pequeñas porciones alícuotas. También se utilizó, para eliminar el ⁵¹Cr no unido, la ultrafiltración o la cromatografía en Sephadex G-50. La autoradiografía (película Kodak Safety Film AA) de cromatogramas

en papel (metanol-agua 3:1) se utilizó como control de la ausencia de ^{51}Cr libre. Las medidas de radi actividad se hicieron en un espectrofotómetro autogamma Packard modelo 5220.

2.2.4. Obtención de ácido ribonucleico crudo.

Se siguió el método de FRIEDMAN (1964). Los ratones inmunizados se matan por dislocación cervical extrayendo sus bazo y macrófagos peritoneales que se congelan inmediatamente con nieve carbónica. Se resuspenden en 3 volúmenes de fenol destilado frío al 88% conteniendo 2 mg/ml de Macaloid (inhibidor de ribonucleasas). A esta mezcla se le añade un volumen igual de tampón fosfato frío 0.02 M pH 7,2, 0.01 M de EDTA (para evitar la formación de complejos ácidos nucleicos-proteínas mediante iones quelantes). La mezcla se homogeniza a 0° C durante 10 minutos con un homogeneizador Virtis. El homogeneizado se centrifuga a 0° C durante 15 minutos a 2.400 g recogiendo la fase acuosa superior. A continuación se le añade a esta fase el mismo volumen de éter dietílico frío con objeto de retirar el fenol que quede. La mezcla se centrifuga a 400 g, la fase superior se descarta y el procedimiento se repite 4 veces más. A la fase acuosa resultante se le da una corriente de N_2 durante 10 minutos con objeto de liberar el éter que pudiese quedar. Se le añaden 0.1 volúmenes de ClNa 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se deja reposar durante toda la noche a 4° C y el precipitado se recoge por centrifugación a 1.200 xg durante 10 minutos en frío. La precipitación se repite una vez mas dejando reposar durante 1 hora a 4° C, centrifugando a continuación todo ellos en las mismas condiciones anteriores. El sedimento resultante se resuspende en 5 ml de tampón fosfato estéril. La muestra se congela a -70° C y se almacena hasta su utilización.

La concentración del RNA obtenido se estima por absorción a 260 nm y 280 nm de una dilución apropiada de la preparación. Si la razón entre $A_{260}/A_{280} \geq 2$ se puede suponer que la preparación de RNA está suficientemente libre de contaminación protéica (PILCH y cols. 1973). La concentración se calcula mediante la fórmula:

$$\text{mg/ml de RNA} = \frac{A_{260} \times \text{factor de dilución}}{E \times l}$$

Donde E es el coeficiente de extinción y l la longitud de la célula en cm. Normalmente una unidad de A_{260} es equivalente a una concentración de RNA de 40-60 $\mu\text{g/ml}$.

2.3. Métodos fisicoquímicos

2.3.1. Espectroscopía ultravioleta

Para este estudio se utilizó un espectrofotómetro Beckman modelo 25, con rendija automática, conectado a un registrador con una velocidad de 20 nm/min, empleando como blanco la solución en la que estuviera disuelta el lipopolisacárido, generalmente Tris-ClH 0.02 M en ClNa 0.1 M.

2.3.2. Espectroscopía infrarroja

Para determinación de los espectros moleculares en la zona del infrarrojo se empleó un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 457, utilizando pastillas de 1 mg de muestra dispersada en 300 mg de BrK.

2.3.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Para estos estudios moleculares de caracter previo, utilizamos un espectrómetro RMN mod. R12, de 60 MHz de Perkin-Elmer y las determinaciones se realizaron sobre 25 mg de LPS disueltos en 0.4 ml de agua pesada o de dimetilsulfóxido. Las condiciones de trabajo fueron: una sensibilidad variable de 4 a 8 e incluso en ocasiones a 32, según los casos, con escala 10 y filtros 2 (para agua pesada) y 3 (para dimetil sulfóxido).

2.3.4. Análisis espectro-colorimétrico del lipopolisacárido.

El lipopolisacárido pudo ser estimado colorimétricamente utilizando el método de EDSTROM (1969), modificado posteriormente por JANDA y WORK (1971), aunque realizando algunas modificaciones personales. El colorante reactivo se preparó disolviendo 10 mg de carbocianina (1-etil-2-[3-[1-etil-naftol (1, 2 d) tiazolin -2-ylidina]2 metilpropenil] nafto [(1,2d) bromuro de tiazolio) en 20 ml de una mezcla a partes iguales de 1,4 dioxano y 0.03 M de acetato sódico tamponado a pH 4 y añadiendo después otros 80 ml mas de tampón. Esta solución es estable en la oscuridad a 2° C durante algunas horas. Antes de usarla se añaden 2 ml de ácido ascórbico 0.1 M (pH final 4) y el colorante reactivo se utiliza antes de que pase 1 hora. A una muestra de 1,5 ml de LPS (1,5 ml de agua destilada o tampón conteniendo 0.15 - 30 μ g de LPS se le añade el tampón (0.6 ml) y el colorante reactivo (0.9 ml). La absorbancia se mide, después de estar en oscuridad a temperatura ambiente de 5 - 10 minutos, en un espectrofotómetro Beckman modelo 25 frente a un blanco sin LPS. Se registran los espectros visibles para cada una de las muestras. Durante todo el ensayo se usan,

tanto para el colorante como para la mezcla de reacción, tubos de polietileno ya que el vidrio puede absorber cantidades significativas de colorante.

2.3.5. Determinación del coeficiente de sedimentación

Los análisis de velocidad de sedimentación se realizaron en una ultracentrífuga analítica Beckman Spinco modelo-E equipada con óptica de Schlieren y sistema RTCT de compensación de temperatura. El LPS fue disuelto en Tris-ClH 0.02 M ClNa, 0.1 M, pH 7,6 y colocado en una célula de sector simple (12 mm, 4° C). La velocidad utilizada fué de aproximadamente 30.000 rpm, y la temperatura se mantuvo a 20° C. Se ha seguido el método expuesto por CHERVENKA (1969).

El coeficiente de sedimentación se calcula según la formula:

$$S = \frac{v}{w^2 r}$$

donde w es la velocidad angular, r es la distancia desde el centro de rotación y v es la velocidad de sedimentación de la molecula estudiada, que se determina mediante la relación:

$$\ln \frac{r_b(t)}{r_b(t_0)} = w^2 S (t-t_0)$$

en la que $r_b(t)$ es la posición del frente en el tiempo t , medida como el máximo del pico en el perfil de Schlieren. Un gráfico de $\ln [r_b(t) / r_b(t_0)]$ frente a $(t-t_0)$ nos da la pendiente de $w^2 S$ y por tanto S , que se expresa en unidades Svedberg (S) (10^{-13} segundos). Este coeficiente de sedimentación S se

corrige aproximadamente a su valor en agua y a la temperatura de 20° C.

$$s_{20,w} \approx \frac{\eta_{T,b}}{\eta_{20,w}} \cdot s_{T,b} \times \frac{1 - \bar{V}_{20,w} \rho_{20,w}}{1 - \bar{V}_{T,b} \rho_{20,b}}$$

Donde $\eta_{T,b}$ es la viscosidad del tampón utilizado en el experimento a la temperatura de este, $\rho_{20,b}$ la densidad del tampón 20°C y $\bar{V}_{T,b}$ el volumen específico parcial de la muestra en el tampón a la temperatura T.

2.3.6. Microscopía electrónica

Para este estudio el LPS fue disuelto en Tris-ClH 0.1 M pH a 7,6 (a una concentración de 1 mg/ml) y examinado al microscopio electrónico después de tinción positiva o negativa. La tinción positiva se hizo colocando una gota de LPS en una rejilla de cobre recubierta de carbono. Después de tres minutos se retira el exceso con un capilar muy fino y la rejilla se deja secar al aire durante unos minutos. Entonces se coloca una gota de acetato de uranilo al 2% y se deja reaccionar durante 8 minutos, lavándose a continuación con agua destilada para, finalmente, dejarla secar al aire.

Para la tinción negativa se mezcla un volumen de LPS con uno de fosfotungstato potásico pH 7,2 al 3%, colocándose una gota de esta mezcla en una rejilla de cobre recubierta con carbono y se retira el exceso con un capilar muy fino. La rejilla se deja secar al aire durante 30 minutos antes de utilizarla. En otras ocasiones se utilizó para la tinción negativa, en sustitución del fosfotungstato potásico, tungstato sódico al 2%. Todas las microfotografías se hicieron en un

Philips EM 300 (Philips Electronics Industries Ltd) utilizando una tensión de aceleración de 60 Kv.

2.3.7. Centrifugación en gradiente de sacarosa del ácido ribonucléico.

Se toman 3 unidades de absorción del extracto de RNA, llevandolo a 0,2 ml con tampón TKM (2 ml Tris 2M pH 7,5, 1 ml de Cl_2 Mg 1 M, 10 ml de CLK 2 M hasta 200 ml con agua destilada). Se centrifuga en gradiente de sacarosa (20% al 5%) en tampón TKM en tubos de nitrocelulosa, (centrífuga Beckman L-30, rotor SW-40.Ti) a 40.000 rpm durante 3 horas a 4° C sin freno. Se hace una punción en el fondo del tubo registrando el gradiente en un monitor de absorción ISCO (mod. UA-4) a 260 nm.

2.4. Métodos biológicos

2.4.1. Pirogenicidad.

Se determinó mediante el ensayo cuantitativo de pirogenos de TENNENT y OTT (1952), midiendo la temperatura a intervalos de 30 minutos durante un periodo de 1,5 horas antes a 5 horas después de la inyección de lipopolisacárido. La temperatura observada 1,5 horas antes de la prueba, se toma como referencia y a cada conejo se le administra 1 ml de lipopolisacárido/Kg de conejo, de una solución conteniendo 0,1 g% de solución salina. Se usaron 3 conejos por dosis.

Por otra parte se realizaron ensayos de pirogenicidad con el lisado de amebocitos de *Limulus* (Pyrogen TM). Para

ello seguimos fielmente las especificaciones de la firma Mallinc Krodtt, preparadora del reactivo y de acuerdo con lo establecido por ROJAS-CORONA y cols. (1969) para este ensayo de coagulación.

2.4.2. Determinación de la dosis letal (DL50)

Las endotoxinas suspendidas en solución salina libre de pirógenos se inyectan intraperitonealmente en ratones blancos Ham/ICR en dosis de 50 a 1.000 $\mu\text{g/ratón}$. Para cada dosis se utilizan 10 ratones y el número de muertes se determina durante un periodo de 24 a 72 horas. La DL50 se calcula según REED y MUENCH (1938)

2.4.3. Actividad antiinflamatoria de la indometacina

Se determinó por la prueba de la carragenina siguiendo el método de WINTER y cols. (1962).

2.5. Métodos inmunobiológicos

2.5.1. Preparación de suspensiones celulares de bazo

Los animales se matan por dislocación cervical o sangría total, sacándoles a continuación el bazo de forma estéril. Este se limpia de tejidos adyacentes colocándolo en una placa petri con 6 ml de solución de Hank (BSS) fría^(*). Entonces se homogeneizan a través de una rejilla de acero inoxidable sobre

(*) ver nota al pie de la pagina siguiente

el tampón. La suspensión se coloca en tubos de 12 ml dejando sedimentar los grandes trozos de tejido durante 4 minutos en hielo o bien se filtra a través de algodón. Se recoge el sobrenadante colocándolo en un tubo de centrifuga y añadiendo mas medio BSS. Se lavan 3 veces a 200 xg durante 10 minutos a 4° C. El último sedimento se resuspende en medio de cultivo a la concentración deseada. Las células viables se cuentan en un hemocitómetro de Thomas directamente en un microscopio de contraste de fases (Leitz Orthoplan) o bien después de teñir con azul de tripano (Serva) al 0.05% (concentración final en la cámara).

2.5.2. Cultivo del mastocitoma P815 Y

Este tumor se mantiene por medio de pases por ratones DBA/2 o bien en cultivos "in vitro". En el primer caso se inyectan 0.1 ml de tampón fosfato pH 7,3 con 10^6 células por vía intraperitoneal. A los 10 días aproximadamente se extrae el fluido ascítico mediante una jeringa, haciendo seguidamente un lavado de la cavidad peritoneal con 3 ml de tampón fosfato

Nota :

Solución de Hank (BSS) (HANK, 1948): 8 gr de ClNa, 0,53 gr de Cl_2Ca , 0,4 gr de ClK, 0,2 gr de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,06 gr de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,09 gr de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y 10 mg de Rojo fenol. Agua destilada hasta 1000 ml. En ocasiones se utiliza con 1 gr/litro de glucosa. Ajustar con NaOH hasta pH 7,3. Esterilizar por filtración.

PBS pH 7,3 : 8 gr de ClNa, 0,2 gr de ClK, 2,8 gr de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 gr $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. Agua destilada hasta 1000 ml. Comprobar pH. Esterilizar por filtración.

salino pH 7,3. Se obtienen un total de 300×10^6 células por ratón, que una vez lavadas (2 veces) a $200 \text{ g} \times 10$ minutos en medio de lavado, se resuspenden en el medio utilizado para congelar, alcanzando hasta una concentración de 10×10^6 células/ml; se distribuyen en alícuotas de 1 ml, congelando-las primero a -20°C y luego almacenándolas a -70°C .

Para el cultivo "in vitro" se inoculan unos 10 ml de medio de cultivo con 100.000 células/ml. Se incuban a 37°C en incubador al 5% de CO_2 . Cada dos días se nutre el cultivo llevándolo a la concentración de 100.000 células/ml con medio fresco.

2.5.3. Cultivo "in vitro" de células de P815 Y en presencia de distintos lipopolisacáridos bacterianos.

Los cultivos con un volumen de 5 ml (50.000 células/ml y $50 \mu\text{g/ml}$ de lipopolisacárido) se incuban a 37°C 5% CO_2 . Cada día se determina el número de células viables.

2.5.4. Obtención de fibroblastos de embrión de pollo

Se utilizan embriones de pollo de unos 10 días que se extraen esterilmente del huevo, desechándose cabeza, patas alas y vísceras. El resto del cuerpo se lava abundantemente con tampón fosfato salino pH 7,2 (PBS) para eliminar hematíes. Se coloca en una placa petri, disgregándolo con tijeras, y volviéndolo a lavar dos veces con PBS. Se coloca el triturado en un matraz tratándolo con tripsina al 0,25% (Difco 1/250)) en solución de Hank a 37°C y con agitación magnética. Pasados 20 minutos se recoge el sobrenadante que se diluye con PBS

frío, guardándolo a 4° C. Se vuelve a añadir tripsina y a los 10 minutos se repite el proceso anterior, así hasta que no quede material. A continuación se centrifugan todos los sobrenadantes a 200 g x 10 minutos, lavándose el sedimento 3 veces con PBS, resuspendiendo con pipeta.

Después del penúltimo lavado se filtra la suspensión a través de una doble gasa. El sedimento final de la última centrifugación se resuspende en medio de crecimiento haciendo a continuación recuento de células viables en un hemocitómetro de Thomas y resuspendiéndolas a 10^6 células por ml. Las células se reparten en tubos (1 ml de células) o frascos hexagonales de vidrio pyrex neutro (10 ml de células) tapados con tapón de goma incubándolos en estufa a 37° C el tiempo necesario para que las células se adhieran a la pared formando un epitelio continuo en monocapa.

2.5.5. Medida de la incorporación de timidina

A los cultivos conteniendo 2×10^6 células por 0.9 ml de medio de cultivo se les añaden distintas concentraciones de mitógenos en 0.1 ml de tampón fosfato salino pH 7,3. Se hacen controles sin mitógeno. Se incuban durante 3 días en un incubador (Forma Scientific Inc mod. 3156) a 37° C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. A las 48 horas de incubación se añaden 2 μ Ci/ml de ³H-Timidina (³H TdR, The Radiochemical Centre, Amersham, actividad específica 16 Ci/mmol) a cada cultivo. A las 72 horas las células se recogen filtrándolas a través de filtros de fibra de vidrio (GF/A, Whatman). Se lavan sucesivamente con 10 ml de tampón fosfato salino pH 7,3, 10 ml de ácido tricloroacético frío al 10% y 2 ml de etanol. Los filtros se secan en estufa y se colocan en viales

con 3 ml en líquido de centello (Tolueno con 0.3% de PPO (2,5-difenil-oxazol) y 0.01% de POPOP (2,2'-p-fenilenbis (4metil-5-feniloxazol) y se cuentan en un espectrofotómetro de centelleo líquido Intertechnique modelo SL32. Los datos se presentan como cuentas $\times \text{min}^{-1} \times 10^{-6}$ células vivas puestas en el cultivo.

La concanavalina A y fitohemaglutinina se esterilizan por filtración a través de Millipore (0.22μ). El sulfato de dextrano se esteriliza a 110°C y el lipopolisacárido se hierve durante 60 minutos.

2.5.6. Procedimientos de inmunización

El suero anti-LPS se obtuvo inmunizando conejos, semanalmente, con los antígenos durante un periodo total de 8 semanas. Las 4 primeras semanas se inyectaron intramuscularmente 0,1, 0,25, 0,50 y 0,75 ml de una solución de LPS (2,5 mg/ml) emulsionada con volúmenes iguales de adyuvante de Freund incompleto (Difco). Las 4 semanas siguientes se inyectaron 0,1, 0,2, 0,2, y 0,4 ml intravenosamente. Una semana después se sangraron por punción cardiaca.

Grupos de 30 ratones se inmunizaron primariamente con una inyección intraperitoneal única con distintas concentraciones de LPS (10, 25, 30, 40, 50, 100, 250 y $500 \mu\text{g}$). Se hicieron sangrías cada día determinándose la curva de respuesta.

La inmunización frente a eritrocitos de carnero se realizó por una inyección intraperitoneal de $2,5 \times 10^8$ eritro-

bitos de carnero (previamente lavados tres veces con tampón fosfato salino 0,15 M, pH 7,2.

La sangre recogida en tubos de centrífuga se deja coagular a 37° C durante 1 hora y después de desprender el coágulo de las paredes se mantiene a 4° C durante 12 horas para que se retraiga el coágulo. Seguidamente se centrifuga a 200 g durante 5 minutos, recogiendo el sobrenadante. Los sueros así obtenidos se guardan en pequeñas alícuotas a -20° C

2.5.7. Inmunoprecipitación en gel de agar

Se siguió la técnica de OUCHTERLONY (1967). El gel soporte era agarosa al 1% en tampón veronal 0.05 M, pH 8,4 (*)

Los portaobjetos (2,5x7 cm) previamente desengrasados se recubren con una pequeña capa de agarosa. Una vez estén secos se les añade 3 ml de agar dejándolos solidificar. Los pocillos se hicieron con un cilindro metálico conectado a una bomba de vacío. Se guardan a 4°C en cajas húmedas.

En el pocillo central se coloca el antígeno y en los 6 pocillos exteriores diluciones del suero que se desee

(*) 8,5 gr dietil barbiturato sódico, 0,25 gr azida sodica, 12 ml ClH 1N. Llevado a 1 litro con agua destilada.

titular en PBS. Se deja incubar a 37° C durante 24 horas leyéndose los resultados con luz indirecta frente a un fondo oscuro. El título del antisuero es la reciproca de la dilución mas baja del antisuero con la que se ha obtenido banda de precipitación.

Las preparaciones antes de teñidas se lavan en PBS durante 72 horas con frecuentes cambios y después con agua destilada. Se secan envolviendolas en papel de filtro húmedo (llenando previamente los pocillos con agua para que no queden burbujas que produzcan resquebrajamiento del agar) a temperatura ambiente.

Una vez secas se tiñen con colorante Negro de almidon 10 B (Merck) al 0,5% (v/v) en 5% (v/v) de ácido acético durante media hora y se lava a continuación con ácido acético al 2% (v/v) durante 30 minutos y 3 veces en agua destilada.

2.5.8. Inmunoelectroforesis

Los portaobjetos se preparan de manera similar a los de la inmunodifusión excepto en la disposición de los pocillos (esta vez en el centro del portaobjetos). Los portaobjetos se colocan en una cubeta de electroforesis ELPHOR, estableciendo conexiones con el tampón con papel de filtro Whatman n° 3. El tampón de electroforesis es veronal 0.05 M pH 8,4 y la electroforesis se realiza con una tensión de 4 voltios por cm. Se utiliza de indicador azul de bromofenol al 1% que se coloca en un pequeño pocillo en el extremo superior mas cercano al cátodo del portaobjetos. Cuando el azul de bromofenol ha recorrido unos 4 cm se da por terminada la electroforesis,

trazándose en la preparación un canal en sentido longitudinal entre los dos pocillos. Se llena este canal con el antisuero y se deja incubar a 37° C durante 24 horas en atmósfera húmeda. La lectura de resultados se realiza de igual forma que en la inmunodifusión.

2.5.9. Hemaglutinación

Se lavan 0,2 ml de eritrocitos de carnero (SRBC) 3 veces con PBS frío durante 10 min. a 500xg. Se lleva el sedimento final al 2% con 10 ml de PBS. Se hacen diluciones seriadas a la mitad con el antisuero (de 1/10 a 1/10.240) en una placa de Terasaki previamente deselectrizada. A 50 μ l de cada dilución de antisuero se añaden 100 μ l de SRBC(al 2%). Se hacen controles con suero no inmune. Al acabar cada placa, se mueve ligeramente para formar una suspensión homogénea. Se deja durante la noche a temperatura ambiente, tapando las placas para evitar la evaporación. Los eritrocitos utilizados en este ensayo deben ser frescos de menos de 3 días. El título de hemaglutininas es la recíproca de la dilución de suero mas alta que da lugar a una completa aglutinación de los glóbulos rojos.

2.5.10. Hemaglutinación pasiva

Se realiza de igual forma que la directa, únicamente que en este caso el antígeno son eritrocitos recubiertos con LPS. 0,2 ml de SRBC se incuban con 0.2 ml de LPS (200 μ g) previamente hervido durante 1 hora, durante 30 minutos en baño de agua a 37° C. Se lavan tres veces con PBS a 500xg durante

10 minutos, llevando el sedimento final a 10 ml igual que en el caso de la hemaglutinación directa. El resto del proceso se sigue de igual forma que en el anterior apartado.

2.5.11. Ensayo de hemólisis de eritrocitos marcados con $^{51}\text{CrO}_4 \text{ Na}_2$.

Esta prueba, que se puso a punto en nuestro laboratorio, consiste en la lisis de eritrocitos especialmente tratados, que se produce por anticuerpos específicos y con intervención del sistema complemento. Los eritrocitos se marcan previamente con ^{51}Cr y pueden estar, o no, recubiertos por la molécula de LPS que se utilizó como antígeno. Se incuban 0,2 ml de eritrocitos de carnero al 3% con 100 μCi de $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ (actividad específica 1 mCi/mmol) en un volumen de 0,2 ml durante una hora a 37° C con agitación ligera. Transcurrido este tiempo se lavan los eritrocitos 3 veces a 4° C para eliminar el CrO_4Na_2 no incorporado. Se lleva el sedimento final a 6 ml, con PBS, quedando la concentración final de eritrocitos al 0,1%.

Se hacen diluciones seriadas a la mitad con los antisueros en PBS. A 100 μl de cada dilución de antisuero se le añaden 50 μl de SRBC marcados al 0.1%. Se deja la mezcla, reaccionar durante 5 minutos y se añade seguidamente 100 μl de complemento de cobaya al 1:19 (v/v).

Se incuba durante 1 hora a 37° C en baño con agitación ligera. Se hacen controles con suero no inmune y de lisis total (en tubos conteniendo 50 μl de eritrocitos marcados y 2 ml de Triton X 100 al 0,5%). La lisis inespecífica por el complemento se determina sustituyendo el suero por PBS. Al final de la incubación, se añaden 1,75 ml de PBS frío por tubo, sedimentando

a continuación los eritrocitos durante 5 minutos a 500xg. Se co-
gen 500 μ l del sobrenadante para recuento en contador Auto-
gamma modelo 5220 de Packard.

En el caso de que se utilicen eritrocitos recubier-
tos con LPS, el ensayo se hará de igual forma, excepto en que
a la media hora de incubación con el $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ se añaden 0,1 ml
de LPS (100 μ g) y se prosigue la incubación hasta la hora.

El tanto por ciento de citotoxicidad específica se
mide mediante la fórmula

$$\% \text{ de Citotoxicidad específica} = \frac{\text{cpm liberadas por la muestra} - \text{cpm liberadas por complement}}{\text{cpm liberadas con Tintón} - \text{cpm liberadas por complement}}$$

El título del antisuero se considera el recíproco de
la máxima dilución de suero que produce un 50% de liberación
de $^{51}\text{Cr. O}_4 \text{Na}_2$.

2.5.12. Determinación de células formadoras de anticuerpos

Se hizo mediante el ensayo de JERNE y cols. (1963)
con algunas modificaciones. Se colocan en un baño de agua, a
47° C, tubos (Labclinics, TH75-13) con 0,6 ml de agar al 0,5%
en solución de Hank con 0.04% de DEAE-dextrano.

Se añaden a continuación 50 μ l de eritrocitos de
carnero (recubiertos o no con LPS) diluïdos al 1:7 (v/v) en
BSS. Seguidamente se añaden 0,2 ml de células de bazo a varias

concentraciones y 50 μ l de complemento de cobaya diluído al 1:3 (v/v), todo ello en solución de Hank. La mezcla se extiende en placa petri (90 x 13 mm) en tres alícuotas de 0.2 ml y se incuba durante 3 horas a 37° C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ (Forma Scientific Inc.).

Las células formadoras de halos de hemolísis se cuentan utilizando luz indirecta. Se utilizan controles de células de animales no inmunizados y de lisis espontánea de eritrocitos. Los resultados se dan como número de células formadoras de anticuerpos/10⁶ células de bazo. En el caso de estudiarse la respuesta anti-LPS se harán controles de especificidad con eritrocitos no recubiertos.

2.5.13. Tratamiento reductor de inmunoglobulinas

Se sigue el procedimiento expuesto por NOWOTNY (1969) con alguna modificación. A 1 ml de suero inmune (de ratón o conejo) se añade una concentración final 0.1 M de β -mercapto-etanol en Tris-ClH 333 mM, pH 8,6 y se deja a temperatura ambiente durante una hora. Seguidamente se añade yodoacetamida en una molaridad semejante a la del β -mercapto-etanol y se deja reaccionar durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Seguidamente se dializa frente a tampón fosfato salino 0.15 M, pH 7,3. Se hacen controles con sueros sin tratar con el reductor. La actividad hemaglutinante de los anticuerpos se analiza antes y después del tratamiento. En algunos casos el tratamiento con el β -mercaptoetanol se realizó en la misma placa de hemaglutinación una vez hechas las diluciones sin alquilación posterior. Después de 1 hora a temperatura ambiente se añaden los eritrocitos y se prosigue la hemaglutinación según se ha explicado anteriormente.

2.5.14. Pruebas de fagocitosis in vitro

2.5.14.1. Obtención de células

Para las pruebas de fagocitosis "in vitro", se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratón a partir de lotes de 5 animales; para ello se inyectaban a cada ratón (por vía i.p.) 2 ml de líquido de Hanks heparinizado y después, 5 minutos mas tarde, se extraía este líquido previo masaje suave de la zona ventral; seguidamente se reunían todos los líquidos, se centrifugaban y se lavaban 2 veces estas células con líquido de Hanks; finalmente, se hacía un recuento para ajustar la suspensión a una concentración aproximada de 5×10^7 a 10^8 células/ml y se mantenían en b.a. a 37°C antes de realizar la prueba.

2.5.14.2. Indice fagocitario

Se realizó por una técnica similar a la de BURROWS y BACON (1956) aunque con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (PEREZ UREÑA y cols. 1972). En esencia, el ensayo consiste en añadir a tubos siliconados de hemolisis, mantenidos a 37°C , 1 ml de la suspensión de macrófagos peritoneales, o de linfocitos, de ratón con 0,1 ml de plasma o suero de ratón obtenido por sangría retro-orbital y 0,1 ml de una suspensión bacteriana en tampón fosfato ($2,5 \times 10^9$ células/ml = 0,3 D.O.₅₀₀). El plasma y las bacterias se mantienen en contacto previo 10 minutos a 37°C para sensibilizarlas, antes de añadir los macrófagos; después, toda la mezcla del sistema se incubaba a 37°C en los tubos dispuestos horizontalmente y rotando de vez en cuando a razón de 16 rpm. Al cabo de 2 h. se retiran los tubos

de la estufa, se centrifugan a 3.000 rpm/10' y se hacen los frotis, que se tiñen por el método de WRIGHT.

En los tubos de ensayo de las endotoxinas, se añadieron éstas en volúmenes de 0,1 ml y a una concentración tal que quedara el LPS a 5 μ g/ml de la mezcla total.

El índice fagocitario se midió anotando el número de bacterias fagocitadas/célula para un recuento total de 100 células.

2.5.15. Determinación de la capacidad inmunosupresora

Dos lotes de conejos, con o sin tratamiento endotóxico previo, fueron inmunizados con lisozima de clara de huevo (Sigma). En las series control, la inmunización por lisozima se realizó mediante 4 inyecciones intramusculares semanales de 0.5 mg, la primera y 1 mg las tres siguientes en un ml de solución salina estéril, y emulsionadas en un volumen igual del coadyuvante de Freund.

A los animales que queríamos suprimir la respuesta inmunitaria se les trataba con 100 μ g de endotoxina por vía intravenosa dos días antes y 14 días después del comienzo del tratamiento con lisozima.

El ensayo de actividad de la lisozima se realizó siguiendo el método de Shugar (1952). La lisis del sustrato se observó con un espectrofotómetro Beckman DB-G a 450 m. Todo ello según la técnica de RUBIO y PORTOLES (1972).

2.5.16. Producción de interferón

Grupos de 10 pollos se inyectan en la vena del ala, o por vía intramuscular, con la estirpe virásica NDV ($10^3 \times$ la dosis DL_{50} en 0.3 ml). El lipopolisacárido de P. aeruginosa o B. melitensis se inyectaron intravenosamente a una dosis de 100 ng/100 gr de peso. Los sueros se extrajeron por punción cardiaca determinando los títulos de interferón a distintos intervalos.

Ensayo de Interferón

Los sueros, recolectados de cada grupo, se utilizaron como interferón. Los sueros de animales inyectados con NDV se calentaron a 53° C durante 30 minutos para eliminar el virus infectante. La titulación del suero se realiza en células de embrión de pollo utilizando una modificación de la técnica de placas de Dulbecco introducida por RONDA y ALONSO (1973). Se hacen una serie de diluciones de interferón en medio de mantenimiento y se añaden a monocapas de fibroblastos de embrión de pollo en placas petri. Después de 24 horas de incubación a 37° C, el interferón se retira y las células se lavan una vez con tampón fosfato pH 7,2. El VSV se diluye hasta contener 100 unidades formadoras de placas por ml y se utiliza como virus desencadenante teniéndolo en contacto con las células 1 hora y media. El virus no adsorbido se retira, añadiendo después una capa de agar nutritivo y dejando incubar las placas durante 24 horas. Entonces se añade otra capa de agar nutritivo, esta vez con rojo neutro y se hace un recuento de los halos de lisis. Los títulos de interferón se expresan como unidades por ml de suero y son las recíprocas de la dilución más alta de suero que reduce en un 50% el número de placas presentes en los controles.

III. RESULTADOS

1. Obtención de endotoxinas

En la Fig. 17 aparecen detalladas las curvas de crecimiento de P. aeruginosa y E. coli. La recogida de las células, igual que en otras estirpes, se realizó al principio de la fase estacionaria. Por otra parte, para controlar la producción en peso, se determinó la relación entre peso seco de células y absorción a 610 nm, como se puede ver en la Fig. 18.

En el cuadro V se muestran los rendimientos obtenidos en el cultivo de las distintas especies bacterianas, en tanto que las variaciones de porcentaje en la obtención de los distintos crudos de endotoxinas aparecen en el gráfico de la Fig. 19. Como se puede ver, el método de WESTPHAL dió visiblemente mejores resultados, en especial cuando se obtienen de la fase acuosa, mientras que la extracción con EDTA produjo un rendimiento del LPS crudo mas bajo.

2. Purificación

Al igual que en la obtención de endotoxinas, en este caso, hemos utilizado distintos procedimientos de purificación para conseguir datos comparativos:

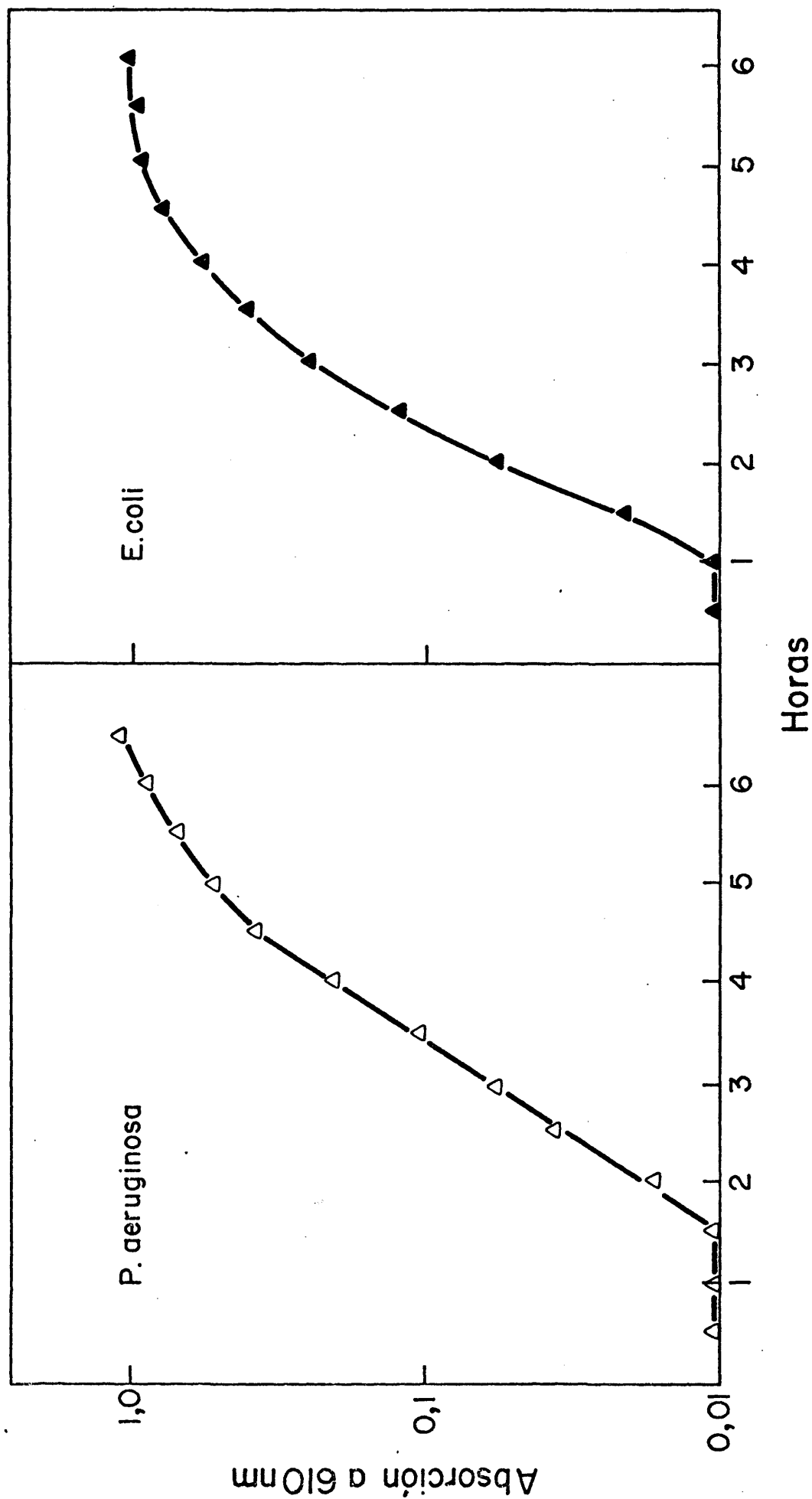


Fig. 17.- Curvas de crecimiento de *P. aeruginosa* y *E. coli* a 37° C con agitación de 250 rpm en incubador metabólico NBC.

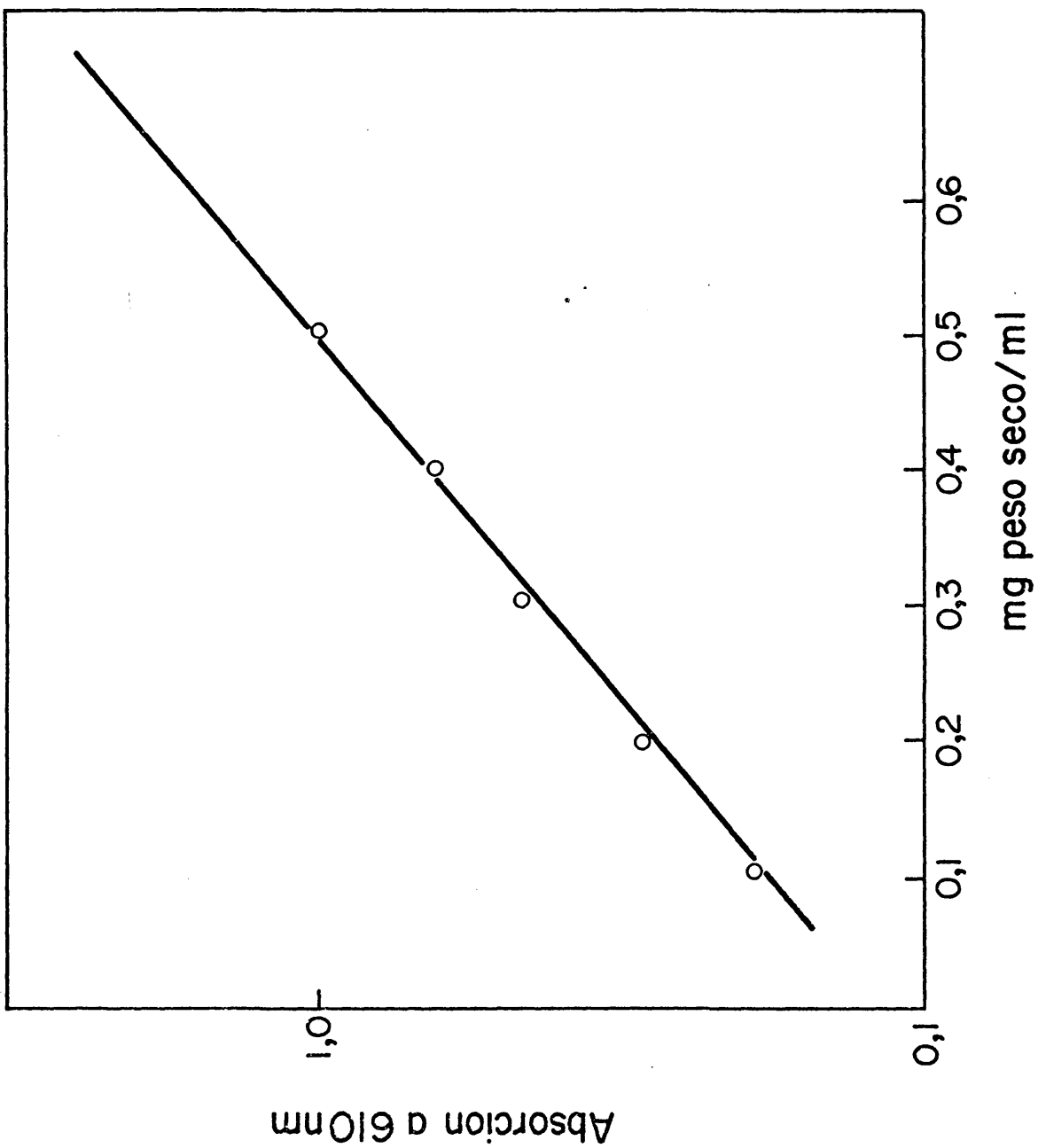


Fig. 18.- Relación entre absorción a 610 nm y peso seco de bacterias.

CUADRO V.- Producción celular, expresada como pesos húmedo y seco, que se han obtenido en el cultivo de las distintas especies bacterianas.

Bacterias	Peso humedo (gr)/ litro de cultivo	Peso seco(gr)/ litro de cultivo
<u>P.aeruginosa</u>	3,8	0,64
<u>S. typhi</u>	4,2	0,7
<u>E. coli</u>	4	0,67
<u>Y.enterocolitica</u>	4,4	0,73
<u>B. abortus</u>	3,9	0,65
<u>B. melitensis</u>	3,7	0,62

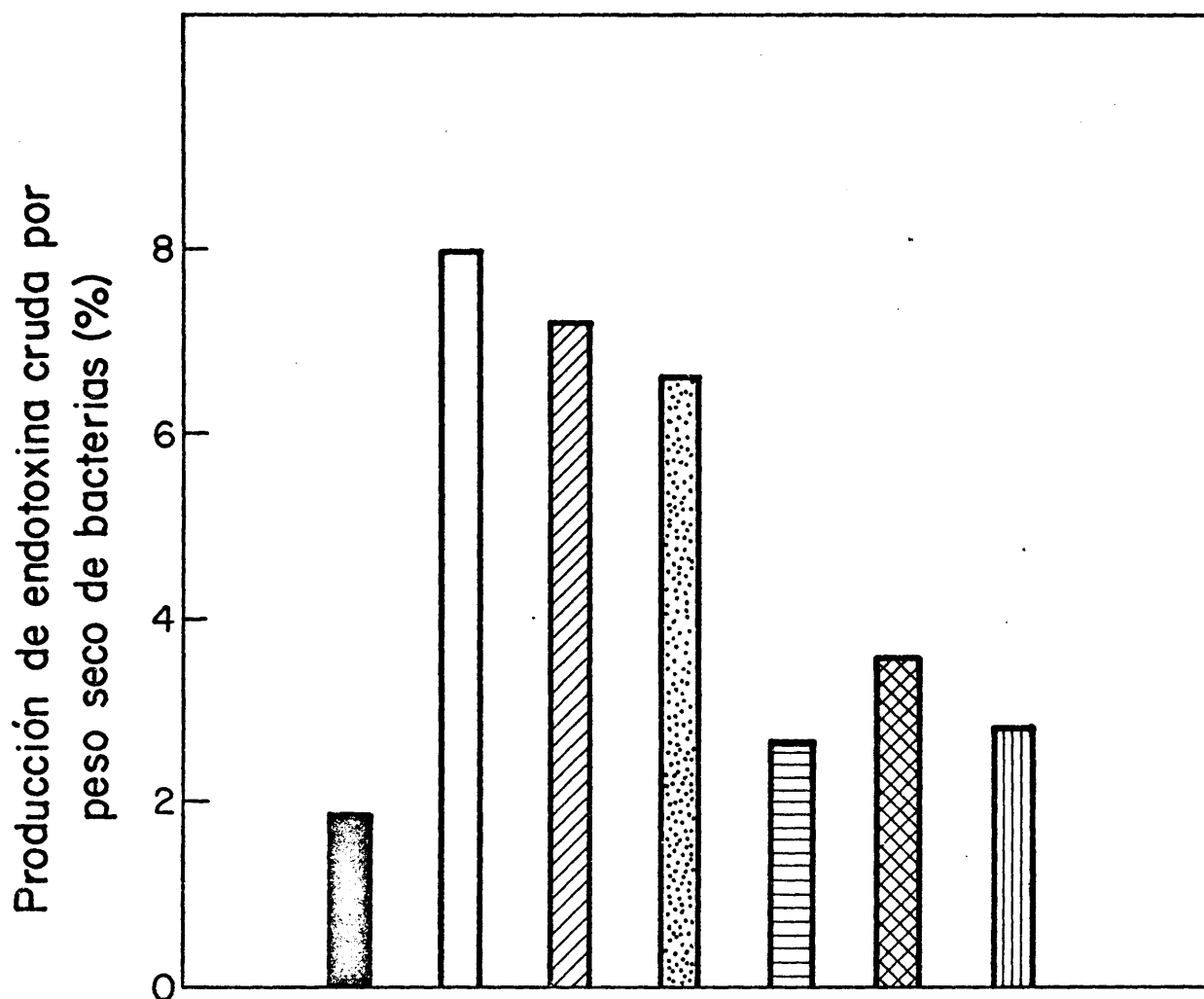


Fig. 19.- Variaciones en la producción de crudos de endotoxina, en función del método de extracción, expresadas como peso seco (g).

■ P. aeruginosa (ROGERS y cols, 1969, EDTA); □ E. coli (WESTPHAL, fase acuosa); ▨ S. typhi (WESTPHAL, fase acuosa); ▩ P. aeruginosa (WESTPHAL, fase acuosa); ▪ B. melitensis, (LEONG y cols. 1970, fase fenólica F5); ▤ B. abortus (LEONG y cols, 1970, fase fenólica F5); ▧ Y. enterocolítica, (LEONG y cols, 1970, fase fenólica, F5).

2.1. Por sedimentación

La purificación de las endotoxinas de E. coli, S. typhi, y P. aeruginosa (WESTPHAL) se realizó por ultracentrifugación según se ha explicado en "Material y Métodos". El grado de purificación se controló mediante los espectros U.V. de los sobrenadantes que resultaban en cada centrifugación. En la Fig. 20 aparecen los espectros U.V. obtenidos con los sobrenadantes de las sucesivas centrifugaciones así como con el sedimento final. En el LPS purificado, el pico de absorción a 260 nm está muy reducido ya que la contaminación por ácidos nucleicos es mínima.

2.2. Por ultrafiltración

Dado que la ultrafiltración es otro procedimiento muy adecuado para eliminar pequeñas moléculas contaminantes de la solución de LPS crudo previamente sometido a tratamiento enzimático, nosotros utilizamos también este método -con los LPS de E. coli, S. Typhi y P. aeruginosa-, para comparar los datos con aquellos obtenidos por el método de sedimentación. En el caso del LPS de P.aeruginosa obtenido a partir de paredes no era necesario realizar una digestión previa con enzimas debido a que la contaminación con ácidos nucleicos era bastante pequeña y no tenían un elevado peso molecular.

La filtración fué proseguida hasta que no se detectó material alguno, en el filtrado, que tuviera un máximo de absorción a 260 nm. En la Fig. 21 aparecen los espectros de tres filtrados sucesivos, después del tratamiento con ribonucleasa y dos después del tratamiento con deoxiribonucleasa.

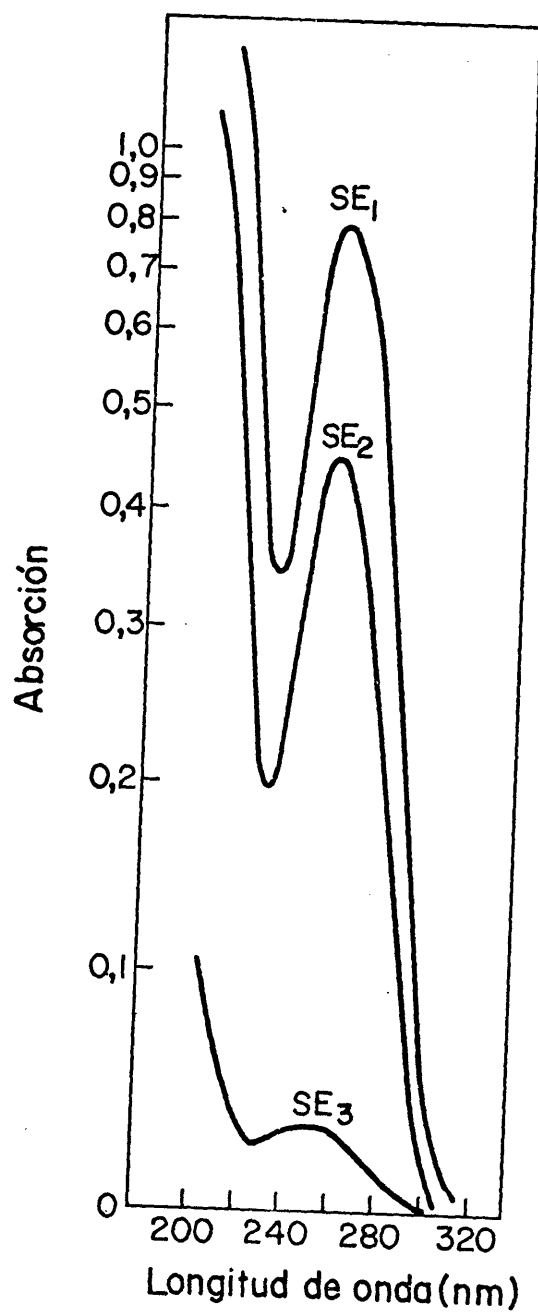


Fig. 20.- Espectros ultravioletas, de los sobrenadantes que resultaron de las sucesivas centrifugaciones.

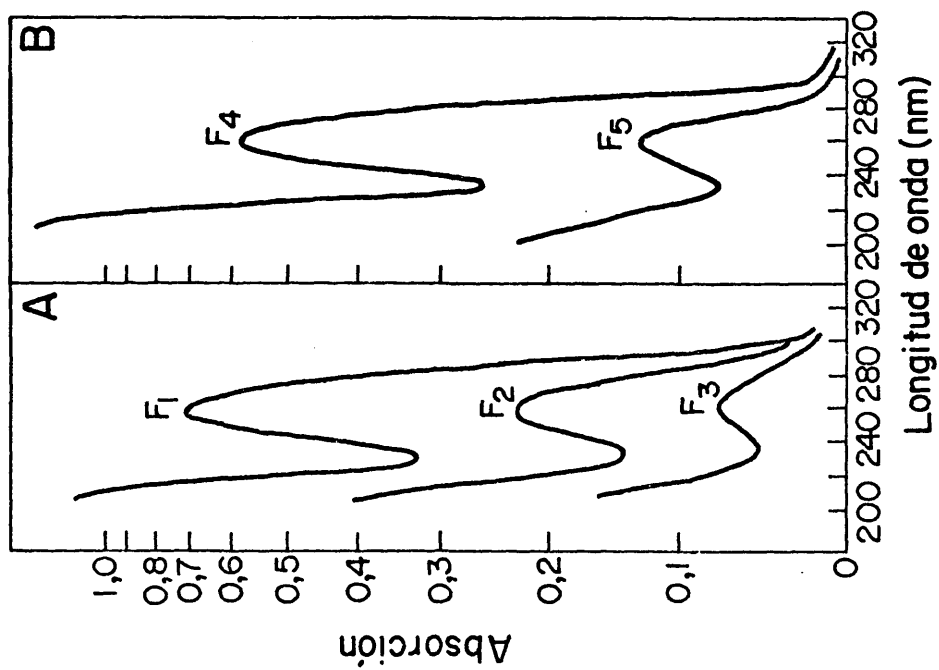


Fig. 21.- Espectros ultravioleta de los filtrados obtenidos después del tratamiento con ribonucleasa (A) y de la digestión posterior con deoxiribonucleasa (B).

* Los filtrados F₁, F₂, F₃ están diluidos al 1/20.

2.3. Cromatografía en gel

Antes de nada consideramos oportuno señalar que en estos ensayos, los parámetros de elución (V_o , V_i) de la columna de Sepharosa 4B, se determinaron según indicamos en el apartado correspondiente de Material y Métodos, y los perfiles de elución obtenidos con azul de dextrano y triptofano se muestran en la Fig. 22. Este procedimiento se ha utilizado, tanto en escala analítica como en la preparativa, con todas las endotoxinas estudiadas en esta Memoria. Primeramente hemos intentado purificar el LPS crudo, a través de Sepharosa 4B, sin tratamiento enzimático previo, y no hemos obtenido resultados mas que en el caso de P. aeruginosa (EDTA), B. abortus, B. melitensis y Y. enterocolítica. El resto de las endotoxinas estaban muy contaminadas con ácidos nucleicos de alto peso molecular de tal forma que no se conseguía una separación neta de los diferentes picos específicos. En la Fig. 23 aparece el característico perfil de elución que hemos obtenido con el LPS crudo de P. aeruginosa (por el procedimiento del EDTA) y que se compara con el del mismo material biológico previamente purificado por ultrafiltración. Como puede verse, el LPS se eluye en el V_o de la columna.

El LPS de B. melitensis, sometido a cromatografía de Sepharosa 4B sin ningún tipo de tratamiento previo da un perfil de un sólo pico, que también se localiza en el V_o (Fig. 24 a), situación a la que se aproxima el LPS de S. typhi (Fig. 24 b), una vez purificado por ultrafiltración.

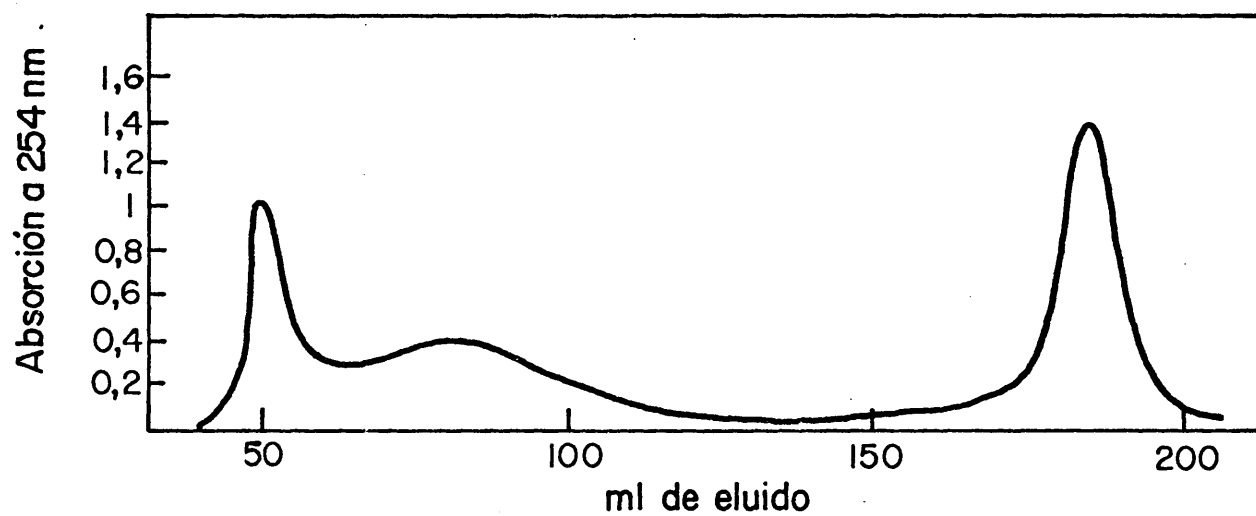


Fig. 22.- Perfil de elución, por cromatografía en Sepharosa 4B, de una muestra de dextrano:azul y triptofano.

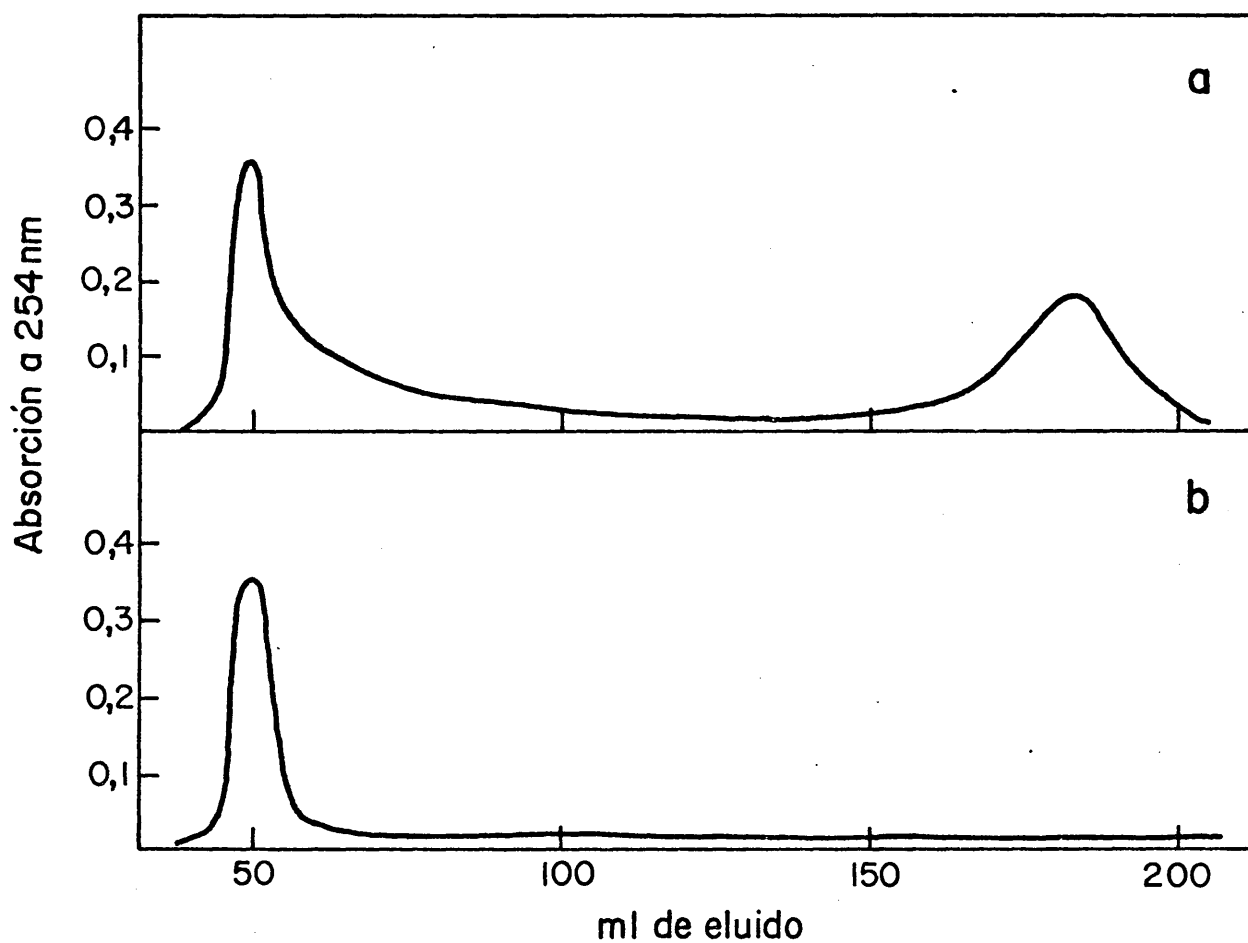


Fig. 23.- Perfil de elución, por cromatografía en Sepharosa 4B, del lipopolisacarido de P. aeruginosa extraído por el procedimiento ROGERS y cols. (1969).

a: LPS crudo; b: LPS purificado por ultrafiltración.

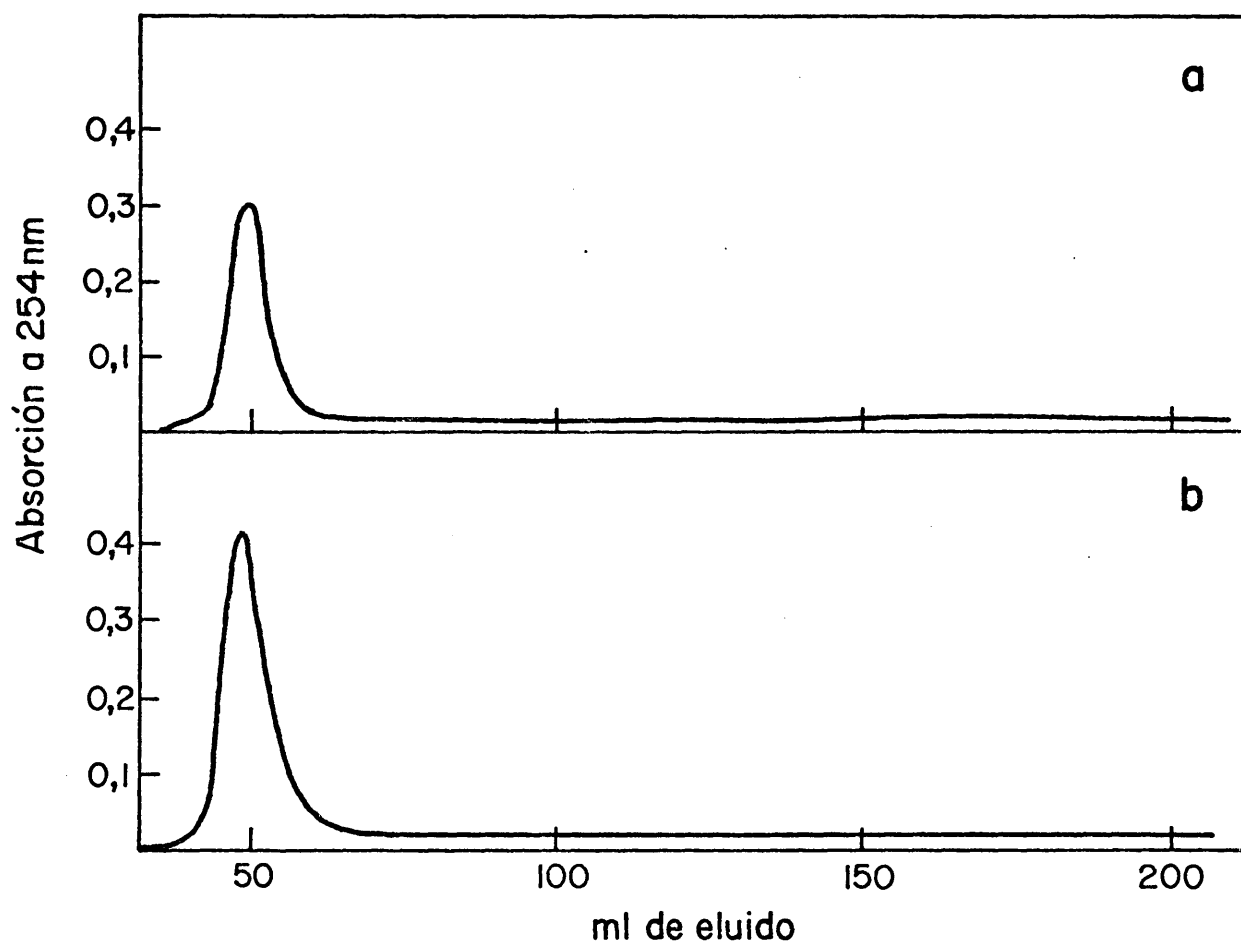


Fig. 24.- Perfiles de elución, sobre Sepharosa 4B, de los lipopolisacáridos de B. melitensis (a) y S. typhi (b), este último previamente purificado por ultrafiltración.

El LPS de P. aeruginosa crudo -obtenido por el procedimiento fenol-agua- cuando se pasa sobre Sepharosa 4 B da un perfil de elución como el indicado en la Fig. 25 a; sin embargo, cuando se trata previamente con nucleasas, se logra una buena separación (Fig. 25 b) de este LPS, que se eluye en el V_0 , y el material digerido que aparece en la zona del $V_0 + V_i$ aproximadamente.

Por otra parte, cuando sometimos a cromatografía en gel los LPS de P. aeruginosa (los obtenidos por el método fenol-agua), previamente purificados por ultrafiltración detectamos únicamente un pico en el V_0 , mientras que por sedimentación todavía apareció un segundo pico. (Figs. 25 c y 25 d).

Como quiera que en todas las preparaciones que teníamos, el LPS quedaba excluido en Sepharosa 4B, intentamos probar la Sepharosa 2B que es capaz de retener pesos moleculares mayores. En la Fig. 26 aparece el perfil de elución del azul de dextrano y triptofano. En la Fig. 27 aparecen como muestra los perfiles obtenidos con el LPS de B. melitensis y de P. aeruginosa (obtenidos por EDTA y fenol-agua, el primero parcialmente purificado). Como puede verse, aunque la cantidad de material fraccionado aumenta, el LPS sigue eluyendo en el V_0 de la columna. Los otros picos corresponden a ácidos nucleicos o a fracciones de LPS degradado.

En el cuadro VI se muestran los rendimientos de LPS purificado por los distintos métodos. Se puede observar que, en líneas generales, la extracción con fenol-agua y la purificación por cromatografía en gel da unos rendimientos bastante buenos.

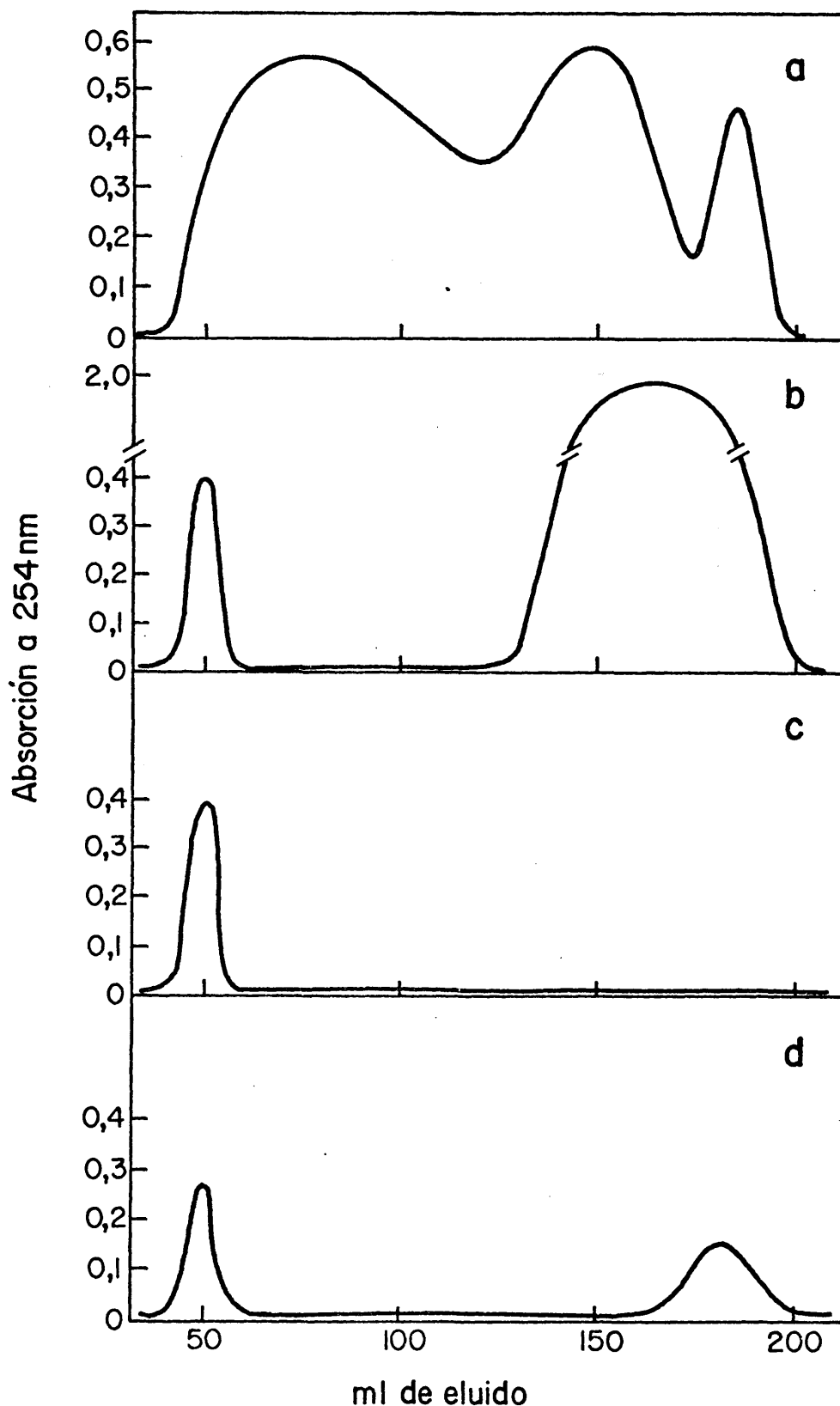


Fig. 25.- Perfiles de elución, por cromatografía en Sepharosa 4B, del lipopolisacarido de *P. aeruginosa* obtenido por el procedimiento de WESTPHAL y JANN (1965). a: LPS crudo; b: LPS tratado previamente con nucleasas; c: LPS purificado previamente por ultrafiltración; d: LPS purificado por sedimentación.

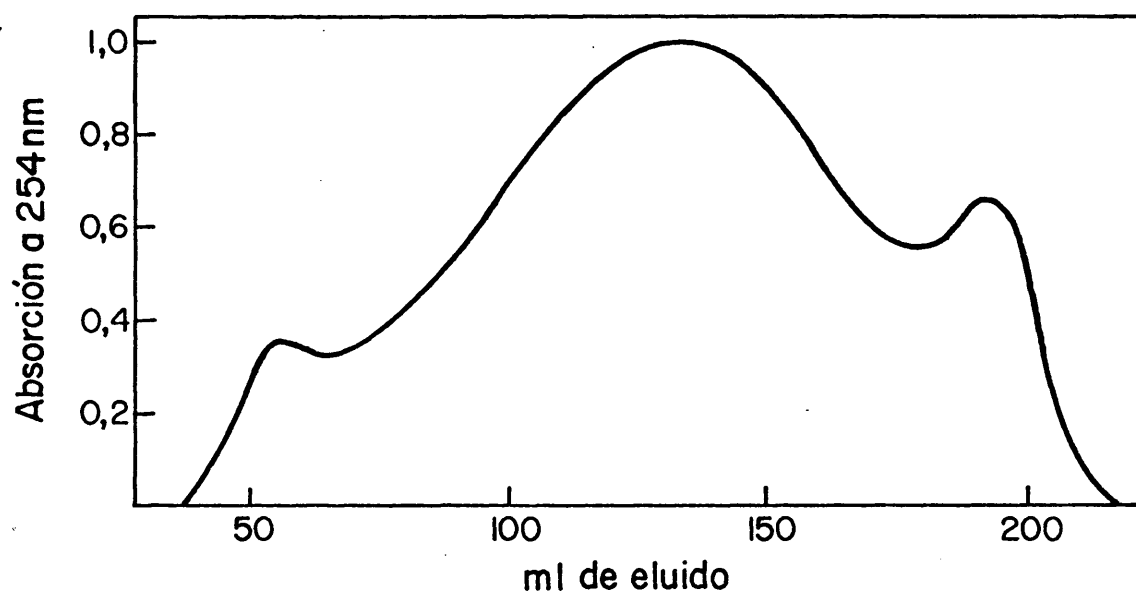


Fig. 26.- Perfil de elución de una mezcla de dextrano azul y triptofano en Sepharosa 2B.

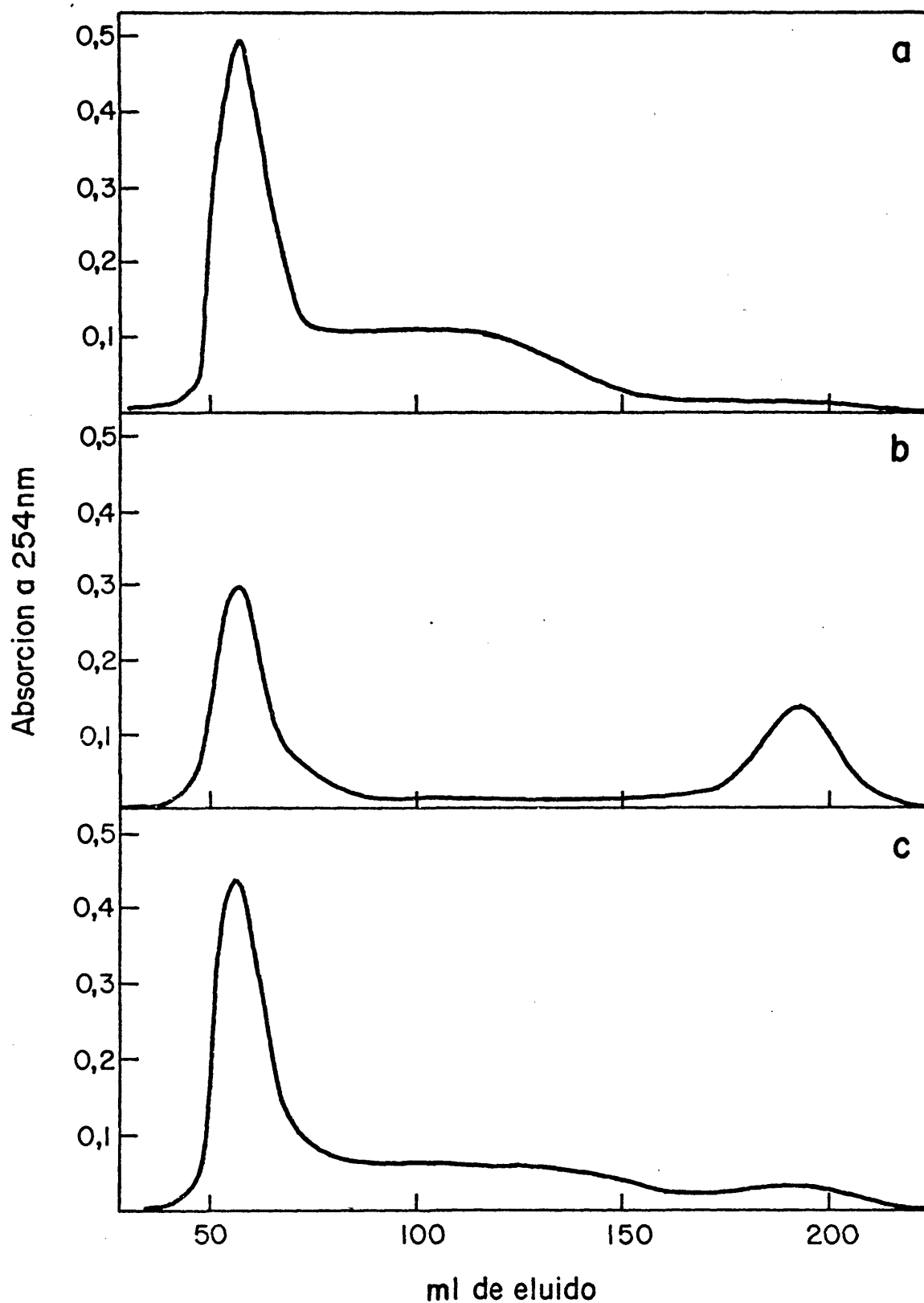


Fig. 27.- Perfil de elución, por cromatografía en Sepharosa 2B, de los lipopolisacáridos de B. melitensis (a), P. aeruginosa (EDTA b) y P. aeruginosa (fenol-agua, c)

CUADRO VI.- Variaciones en la producción de lipopolisacaridos, obtenidos y purificados por distintos métodos.

Bacterias	Procedimiento obtención	Rendimiento en % de bacterias secas del LPS purificado.		
		Sedimentación	Ultrafiltración	Cromatografía en gel
<u>P.aeruginosa</u>	EDTA fenol-agua	1	1,2 2,9	0,9 2,5
<u>B. melitensis</u>	fenol-agua (F ₅)	-	-	2,3
<u>B. abortus</u>	fenol-agua (F ₅)	-	-	2,7
<u>Y. enterocolitica</u>	fenol-agua (F ₅)	-	-	0,43
<u>E. coli</u>	fenol-agua	1,1	4,3	4
<u>S. typhi</u>	fenol-agua	1,8	3,2	2,7

3. Obtención de endotoxinas marcadas con isótopos

Según indicamos en el apartado de Métodos, realizamos el marcado isotópico de dos endotoxinas (de *Pseudomonas* y *Brucella*) con un rendimiento variable. En el caso en que acudimos al marcado "in vivo" del LPS de *P. aeruginosa* con glucosamina-6-³H, el rendimiento fue bastante bajo consiguiendo actividades específicas de alrededor de 50.000 dpm x mg⁻¹ de LPS en preparaciones ya purificadas. La endotoxina marcada de esta forma conserva el mismo comportamiento en cromatografía en gel, idénticas características espectroscópicas y reacción colorimétrica que la no marcada. Su actividad biológica también es la misma y por tanto, hay que utilizar dosis pequeñas, que, dado su mínima actividad específica dificultan las experiencias de control isotópico del metabolismo de la endotoxina. Cuando el marcado de la endotoxina se realizó con CrO₄Na₂ (⁵¹Cr) obtuvimos mejores resultados. El rendimiento obtenido es para el LPS de *B. melitensis* de 4,62x10⁶ dpm/mg de LPS y para el de *P. aeruginosa* 3,96x10⁶ dpm/mg. Los resultados de este marcado están expresados en el cuadro VII. El producto presentó una estabilidad bastante buena según comprobamos por cromatografía en Sephadex G-50, dialisis y cromatografía en papel.

4. Control analítico y caracterización de los lipopolisacáridos obtenidos.

Para este propósito acudimos al examen comparativo de los espectros obtenidos en diversas zonas de longitudes de onda e incluso, por vía de ensayo, intentamos caracterizar

CUADRO VII.- Datos cuantitativos obtenidos mediante marcado con $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ de las endotoxinas de P. aeruginosa y B. melitensis.

Datos del marcado:	PLS de <u>P. aeruginosa</u>	LPS de <u>B. melitensis</u>
mg de endotoxina de partida	15	15
μg de ^{51}Cr añadido	1,116	1,116
μCi de $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ añadidos	112	112
dpm/mg de endotoxina marcada	$3,96 \times 10^6$	$4,62 \times 10^6$
μCi de $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ por mg de endotoxina	1,8	2,1
μg de ^{51}Cr por mg de endotoxina	$1,8 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-2}$

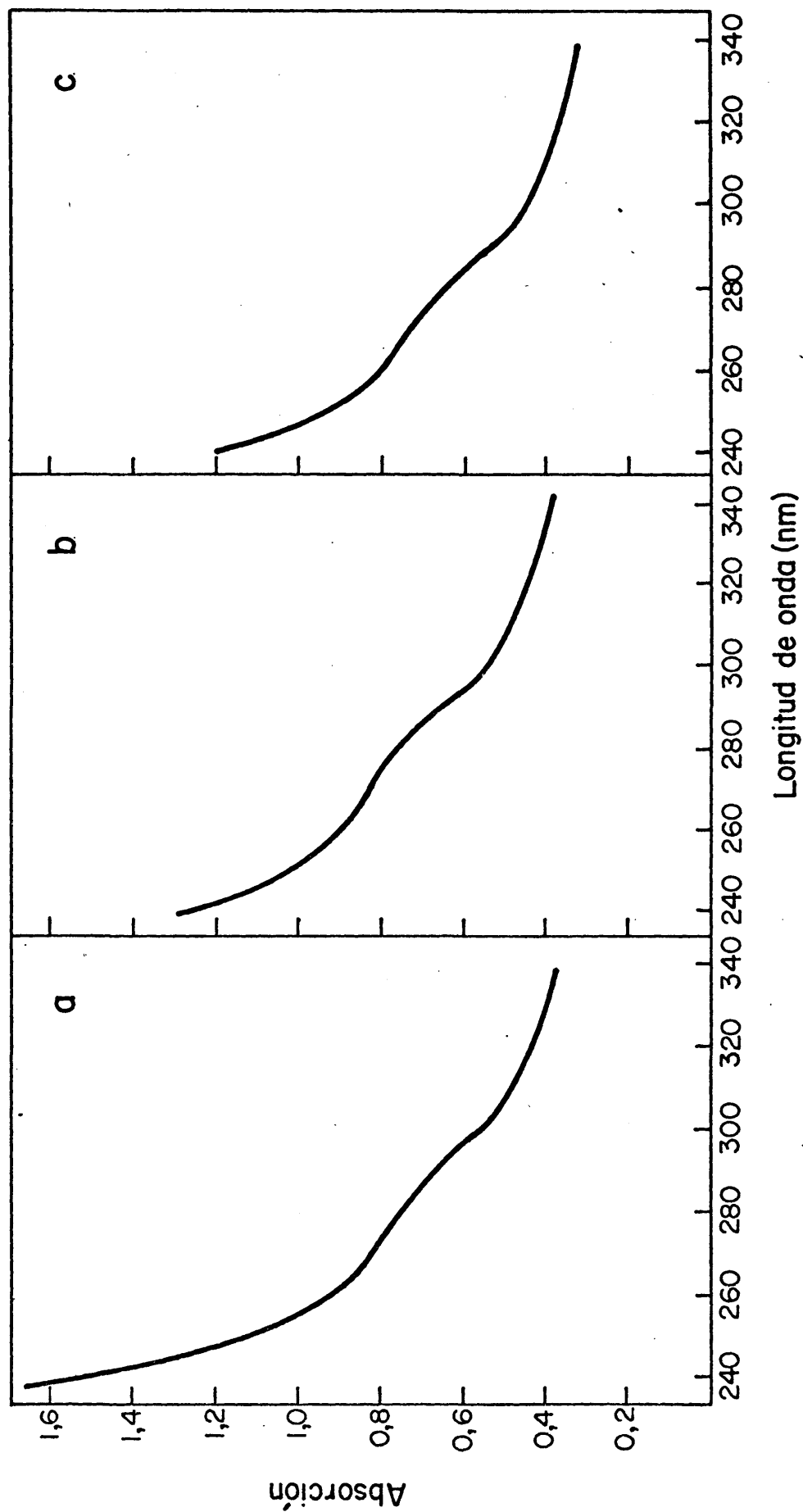


Fig. 28.- Examen comparativo de los espectros U.V. de algunas de las endotoxinas que han sido objeto de nuestro estudio. a, *B. melitensis*, b, *P. aeruginosa* (EDTA) y c, *P. aeruginosa* (fenol-agua)

bandas específicas por espectroscopía de resonancia magnética.

4.1. Espectroscopía ultravioleta

En la figura 28 aparecen los espectros ultravioleta de algunas de las endotoxinas obtenidas por nosotros y en todos ellos se puede observar el mismo aspecto típico.

La presencia de ácidos nucleicos se detectó mediante la absorción a 260 nm del LPS; por tanto, la ausencia de un máximo en esta longitud de onda nos indicó que las preparaciones endotóxicas aparecían libres de ácidos nucleicos. No resulta fácil sacar muchos datos de estos espectros, ya que están relativamente libres de características específicas en esta zona del ultravioleta cercano, como corresponde a la composición química del LPS; únicamente aparece una cola de absorción que procede del U.V. lejano y como un fenómeno de dispersión de luz.

4.2. Espectros infrarrojos

En la figura 29 aparecen los espectros IR del LPS de P.aeruginosa crudo (EDTA, A) y del purificado por cromatografía en gel (B), mientras que en la figura 30 se comparan distintas muestras correspondientes a LPS crudo (A) (obtenido por el método del fenol-agua) con los purificados por ultrafiltración (D) cromatografía en gel (B), una combinación de ambos métodos (E) y sedimentación (C).

El análisis detallado de estos espectros nos demostró que el LPS crudo (obtenido con fenol-agua), figura 30 (A)

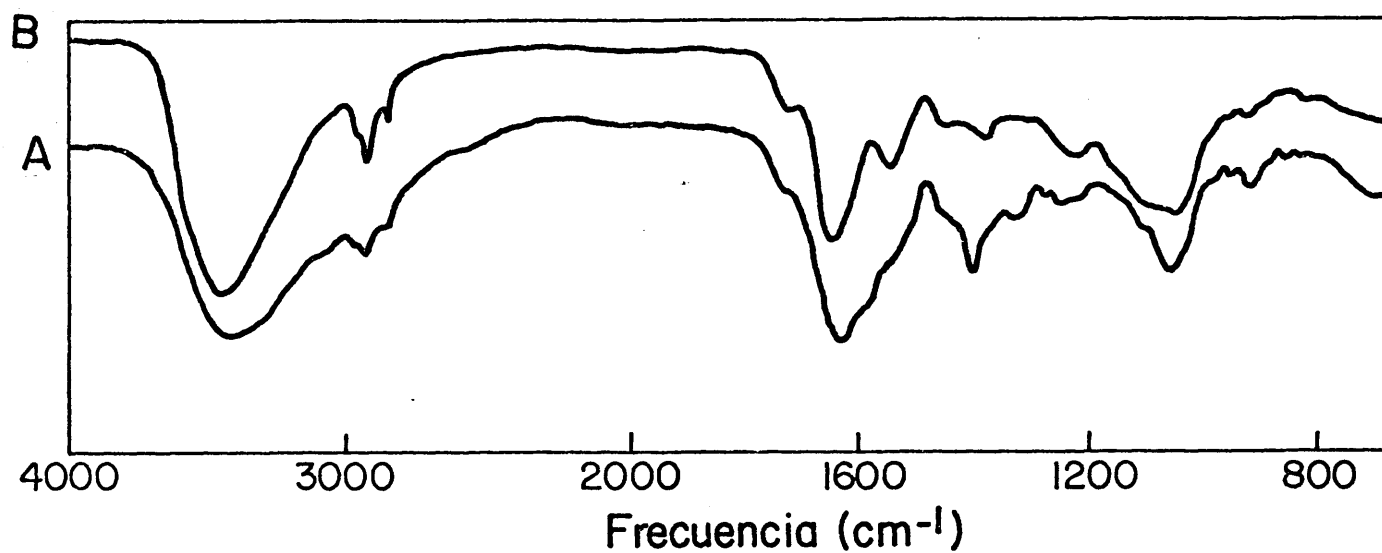


Fig. 29.- Espectros infrarrojos, del LPS de *P. aeruginosa* crudo, extraído por EDTA (A) y purificado por cromatografía en Sepharosa 4B (B).

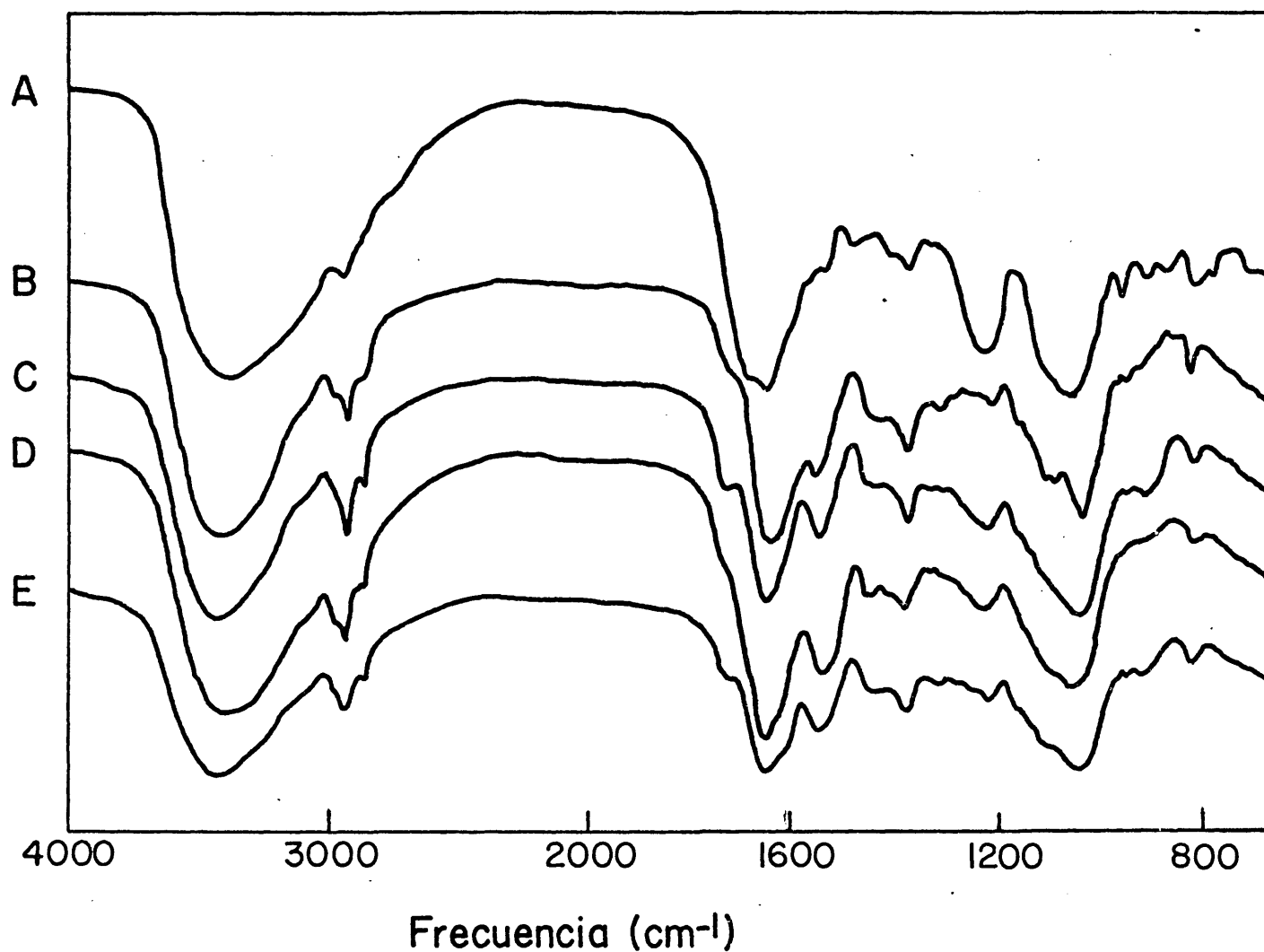


Fig. 30.- Espectros infrarrojos del lipopolisacárido de *P. aeruginosa* crudo, extraído por el procedimiento de Westphal (A) y los purificados por cromatografía en Sepharosa 4B (B) por sedimentación (C) por ultrafiltración (D) y por combinación de este último método con cromatografía en gel de Sepharosa 4B (E).

presenta bandas de absorción características de ácidos nucleicos: a 1230 cm^{-1} , que es asignable a la vibración de valencia "stretching" antisimétrica del grupo PO_2^- con dos enlaces parcialmente dobles en la cadena principal de azúcar-fosfato y a aproximadamente 1065 cm^{-1} atribuida a la vibración simétrica correspondiente. Además presenta otras bandas a 960 y 815 cm^{-1} , características de la cadena principal de DNA y RNA respectivamente. Todas estas bandas desaparecen o se reducen mucho en las moléculas purificadas, dependiendo del grado de purificación. También desaparecen con la purificación otras bandas características de ácidos nucleicos: banda a $1690\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$ atribuible a la vibración de pares de bases A-T, A-U, G-C unidos por puentes de hidrogeno (KYOGOKU y cols. 1961), así como la de 1480 cm^{-1} debida al par A-T (TSUBOI, 1968). Por otra parte, en los espectros de muestras purificadas aparecen bandas entre 900 y 1150 cm^{-1} típicas de polisacáridos.

De acuerdo a los espectros IR, el LPS crudo (EDTA), (Fig. 29A) tiene una contaminación mucho mas pequeña de ácidos nucleicos que el LPS crudo (fenol-agua) (Fig. 30A). Esto está de acuerdo con lo observado en los perfiles cromatográficas.

Con la purificación del LPS (EDTA), (Fig. 29B) desaparecen en el espectro las bandas situadas a 1600 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} -correspondientes a la vibración de valencia asimétrica y simétrica de iones carboxílico COO^- existentes en polisacáridos ácidos ó en aminoácidos.

Las principales analogías y diferencias entre los

espectros IR de el LPS de P.aeruginosa obtenido por el método del fenol-agua y que son consecuencia de los distintos procedimientos de purificación (Fig. 30) afectan a las bandas que se enumeran a continuación: Bandas de absorción situadas a 825 cm^{-1} correspondiente a la vibración del anillo de polisacaridos; a $1050\text{-}1045\text{ cm}^{-1}$ (vibración de valencia de grupos C-O/C-C de polisacaridos); la banda en 1220 cm^{-1} (vibración O-H de deformación "bending" en el plano de moléculas de polisacaridos y/o vibración de valencia del grupo C-O de lípidos); en 1450 cm^{-1} (vibración de tijera del grupo CH_2 de polisacaridos); las situadas a 1650 cm^{-1} (CONH, amida I vibración "stretching" del grupo $\text{C}=\text{O}$), y 1547 cm^{-1} (CONH amida II vibración de deformación NH en el plano); las situadas a 2860 cm^{-1} y a 2930 cm^{-1} (vibraciones de valencia simétricas y asimétricas respectivamente de los grupos CH_2 y CH simétrica de lípidos y polisacaridos); y, finalmente, a $3400\text{-}3440\text{ cm}^{-1}$ (vibración O-H "stretching" de polisacaridos todas las bandas presentan variaciones apareciendo con mayor o menor intensidad según que las moléculas de LPS de P.aeruginosa haya sido purificada por sedimentación, cromatografía en gel, ultrafiltración ó combinación de estos últimos métodos.

Las bandas a $1045\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$, 2930 cm^{-1} , 2860 cm^{-1} y 3440 cm^{-1} presentan una intensidad relativa menor en el caso de que el LPS haya sido purificado por cromatografía en gel, combinada por ultrafiltración (E); mientras que las situadas a 1547 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} disminuyen en el caso de lipopolisacaridos purificados por ultrafiltración y columna (E) y también en las muestras purificadas por sedimentación (C).

Por otra parte, en el caso de LPS purificados por cromatografía en gel (B), desaparecen la banda situada a 920 cm^{-1} (cuya atribución no es inmediata en nuestro caso); mientras que las situadas en 1120 cm^{-1} (vibración de deformación del grupo -OH de polisacaridos), 1170 cm^{-1} (vibración de valencia C-O-C de polisacaridos) y 1320 cm^{-1} (vibración "wagging" CH_2 de lípidos y polisacaridos) desaparecen en el caso de los LPS purificados bien por cromatografía ó por ultrafiltración; la situada a 1730 cm^{-1} (vibración de valencia C = O de lípidos) disminuye mucho, en el caso del LPS purificado por ultrafiltración.

En relación, con las bandas situadas a 1650 cm^{-1} y 1547 cm^{-1} , JENNINGS y cols (1973) suponen que éstas pueden ser debidas a grupos amida monosustituidos ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$) de moléculas tales como N-acil-hexosaminas; esta interpretación serviría para formar un criterio sobre la posible contaminación de proteínas que parece existir en estas moléculas endotóxicas y que originarían también bandas similares.

Resumiendo, mediante espectroscopia IR se pueden controlar las impurezas de ácidos nucleicos que existen en las endotoxinas sin purificar y conocer el grado de purificación alcanzado por la observación de la intensidad de las bandas correspondientes. Así mismo, las bandas atribuibles a enlaces peptídicos originadas por proteínas contaminantes parecen reducirse durante la purificación, sobre todo en el caso del LPS purificado por ultrafiltración y sucesiva cromatografía en gel (E) y el sedimentado (C).

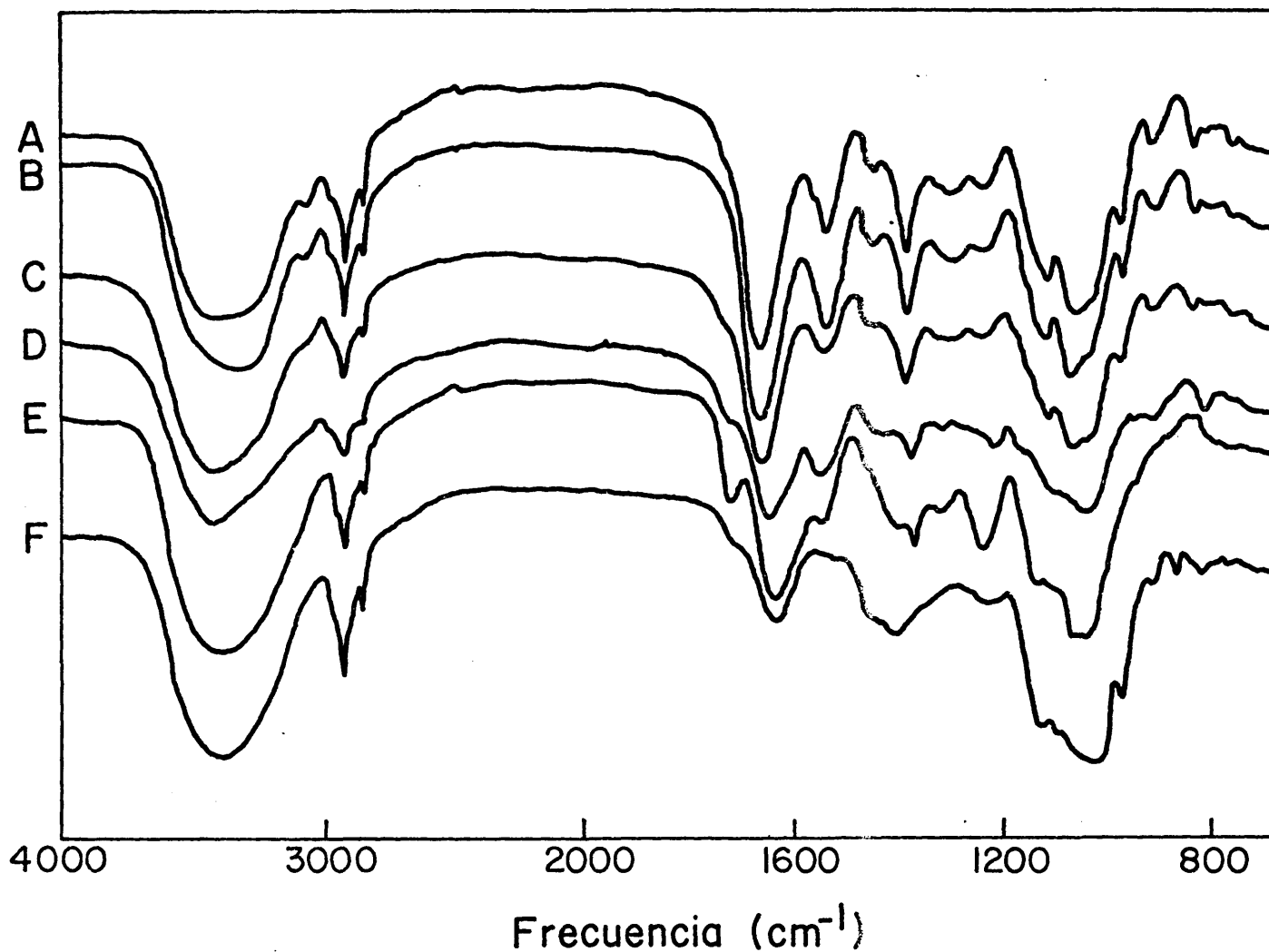


Fig. 31.- Espectros infrarrojos de las endotoxinas obtenidas B. meli-
tensis (A), B. abortus (B), Y. enterocolitica (C), P. aeru-
ginosa (D) E. coli (E) y S. Typhi (F)

Si comparamos los espectros IR del LPS (EDTA) purificado por cromatografía en gel (B de la Fig. 29) y el LPS (fenol-agua) purificado por ultrafiltración (E de la Fig. 30) nos encontramos que este último presenta menos acentuadas las bandas amida I y amida II. Por otra parte aparecen siempre en los espectros IR de ambas moléculas, cuando están purificadas, tanto las bandas típicas de polisacáridos, como las del enlace peptídico que como hemos dicho puede ser debido a la presencia de N-acilhexosaminas. También existe siempre una fracción lipídica.

Seguidamente realizamos un estudio comparativo de las variaciones en los espectros IR según la especie bacteriana de donde habíamos obtenido las diferentes endotoxinas. Así la Fig. 31 recoge los espectros IR de las endotoxinas obtenidas a partir de E.coli, S.typhi, B.abortus, B.melitensis, Yersinia enterocolitica y P.aeruginosa. De esta figura se deduce que las endotoxinas extraídas de B.abortus, B.melitensis y Y.enterocolitica tienen una composición similar. Las bandas amida I y amida II características del enlace peptídico de proteínas y N-acilhexosaminas son muy intensas principalmente en los dos primeros casos. La banda C = O a 1730 cm^{-1} está muy poco definida; sin embargo las bandas a 2930 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} características de las cadenas polimetilénicas están muy definidas. Por otra parte aparece la banda a 840 cm^{-1} característica de enlaces α -glicosídicos. El espectro de S.typhi corresponde prácticamente al espectro de un polisacárido y las bandas del enlace peptídico son muy débiles. La banda a 975 cm^{-1} muy acusada en los 4 espectros anteriores podría ser atribuida a una vibración "rocking" de grupos $-\text{C}-\text{CH}_3$ terminales de azúcares.

El espectro correspondiente al E.coli presenta muy acusadas a 1730 cm^{-1} ($\text{C} = \text{O}$), y a 1230 cm^{-1} que pueden atribuirse a una mayor proporción de lípidos.

Finalmente de la endotoxina objeto de este estudio P.aeruginosa ya ha sido comentado y en la figura se ve que corresponde a un tipo de polisacarido con estructura diferente a los obtenidos de los otros 5 microorganismos. La relación proteínas/polisacaridos se aproxima a la del LPS de Y.enterocolitica.

4.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Dado el interés creciente que la espectroscopía de resonancia magnética de protones está adquiriendo en estudios moleculares de distinta aplicación biológica, quisimos realizar algunos estudios previos que nos orientaran sobre las dificultades y posibilidades de aplicación a nuestro problema de estudiar la endotoxina de P. aeruginosa

Así, obtuvimos los espectros del LPS aislado por el metodo de Westphal y purificado por columna. La Fig 32 da idea de los resultados obtenidos, según que se utilice como liquido de disolución agua pesada o dimetil sulfoxido, respectivamente.

En cuanto a la interpretación de los espectros nos encontramos, en el primer caso (Fig. 32 a), con tres bandas muy claras; una primera situada a 1,8 ppm que muy posiblemente esté producida por protones de algunos nucleósidos existentes como impurezas, otra a 6,65 ppm correspondiente a los protones de moléculas glucídicas normales y otra a 8,8 ppm producida por los grupos $-CH_2$ de las cadenas lipídicas. Después, se observa un indicio de banda a 4,2 ppm que podía corresponder a protones anoméricos de las moléculas glucídicas, aunque esto es dudoso por existir otra señal casi simétrica a los 6,65 ppm

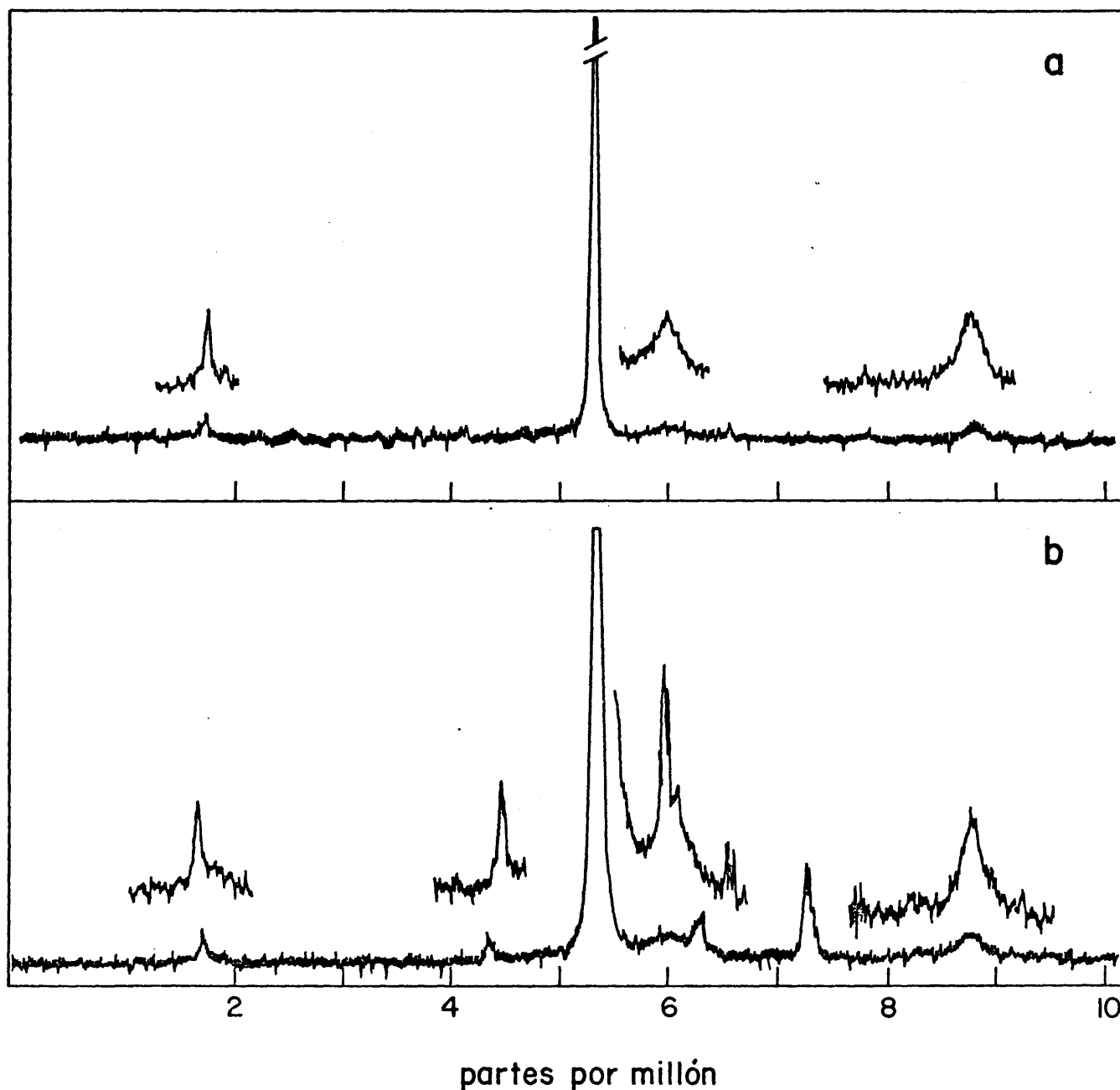


Fig. 32.- Espectros de resonancia magnetica nuclear del lipopolisacárido de *P. aeruginosa* extraído por el método de Westphal en agua pesada (a) o dimetil sulfóxido (b)

y una señal a 9,2 ppm -que se inicia cuando se aumenta la sensibilidad- que corresponde a los grupos metílicos de los lípidos.

Estas mismas señales se aprecian en los espectros realizados con dimetilsulfóxido y además las dos bandas características de este disolvente, situadas a 7,25 - 7,3 ppm y que pueden servir de testigo; y otras bandas, que aparecen en las zonas de 4,4 a 4,7 y de 5,9 a 6,7 ppm respectivamente, que son simples artefactos producidos por el disolvente orgánico en medio acuoso.

4.4. Estudio de la reacción para la determinación colorimétrica del LPS.

Para ello seguimos el método de JANDA y WORK, 1971, pero antes quisimos comprobar las características del colorante y con este propósito obtuvimos el espectro del reactivo coloreado frente a un blanco. En la figura 33 se puede ver que este colorante tiene un máximo de absorción a 510 nm. A continuación obtuvimos el espectro de los complejos LPS-colorante frente a un blanco con colorante. En este caso utilizamos como referencia polisacáridos de P. aeruginosa y DNA y RNA de B. subtilis, cuyos espectros aparecen en la figura 34; en ella se puede ver que los polisacáridos presentan un único pico en la zona de los 610 nm, mientras que los ácidos nucleicos crudos presentan dos máximos, uno a 620 y otro a 610 nm..

Por otra parte, en la fig. 35, se aprecian las diferencias existentes en los espectros del LPS crudo (fenol-agua) de P. aeruginosa, LPS purificado por ultrafiltración, y el

LPS purificado por ultrafiltración y columna (utilizamos aproximadamente $10\mu\text{g/ml}$ de LPS como concentración final en el tubo de reacción). En estas muestras se puede ver que en todos ellos existen dos máximos de absorción, uno a 472 nm y otro a 640 nm, apareciendonos una zona de absorción negativa alrededor de los 510 nm.

En el caso del LPS crudo, ambos máximos son de menor intensidad que en las otras dos muestras, apareciendo -el de 640 nm- mas amplio y desplazado a 620 nm y presentando un hombro a 570 nm; seguramente, ésto se debe a la gran contaminación con ácidos nucleicos, cuyos productos de reacción tienen máximos de absorción a 620 nm (DNA) y a 600 nm (RNA). El LPS purificado por ultrafiltración y por cromatografía en columna dá un espectro muy parecido al purificado por ultrafiltración únicamente.

En la figura 36 se establece una comparación en los espectros obtenidos con el LPS (EDTA) de P. aeruginosa crudo y el purificado por cromatografía en gel.

El máximo a 640 nm en el crudo está desplazado hacia 620 nm, teniendo un hombro a 570 nm. En ambos casos los máximos de absorción son menores que en el caso del LPS purificado.

En la figura 37 aparecen los espectros visibles de los complejos endotoxina-colorante formados con LPS de B.melitensis, y el de E.coli. Como puede verse, el correspondiente al LPS de B.melitensis, presenta el máximo a 470 nm, mientras que el de 640 nm es muy pequeño. El de E.coli presenta los dos máximos.

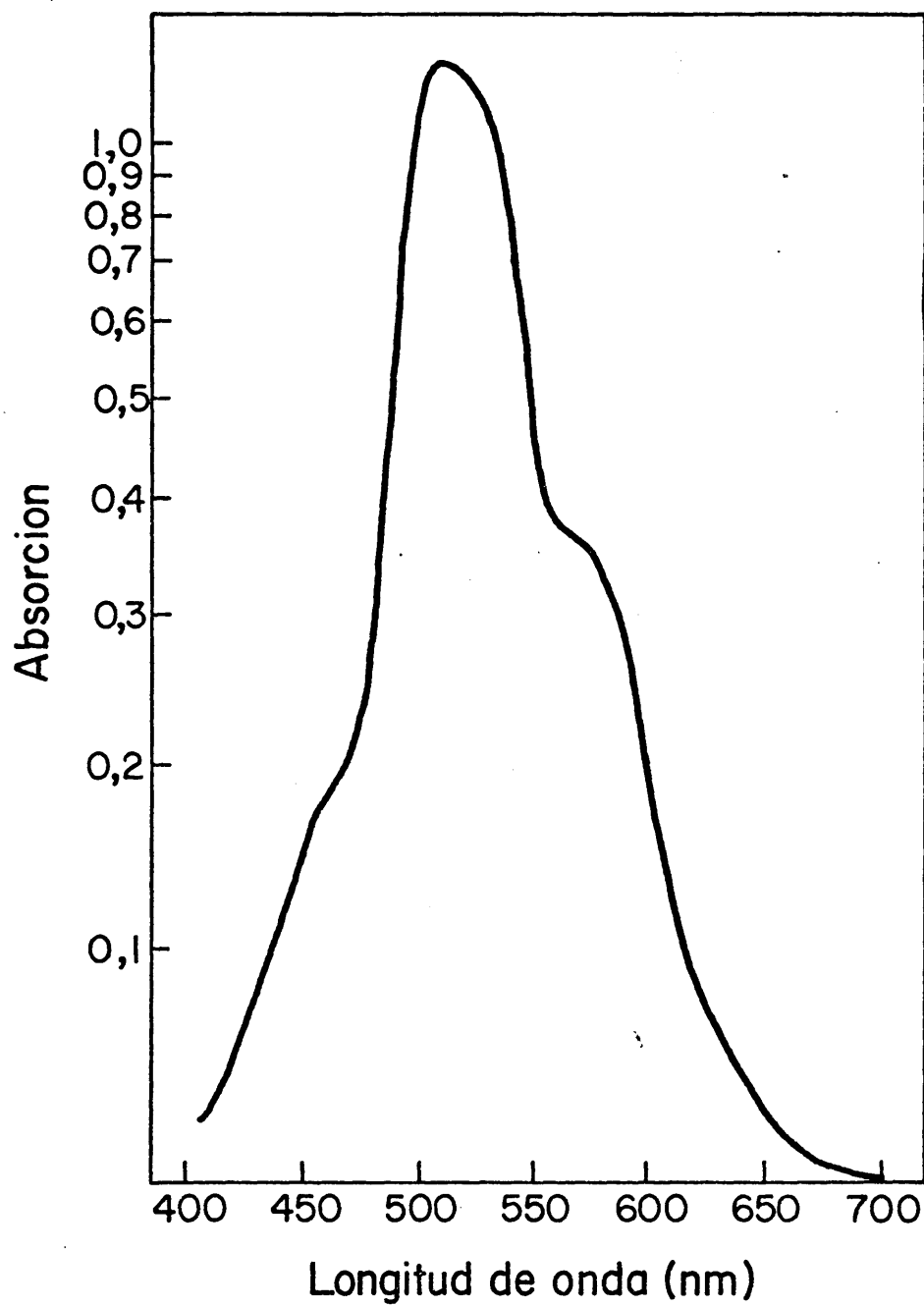


Fig. 33.- Espectro visible del reactivo coloreado frente a un blanco sin colorante (dilución 1/2).

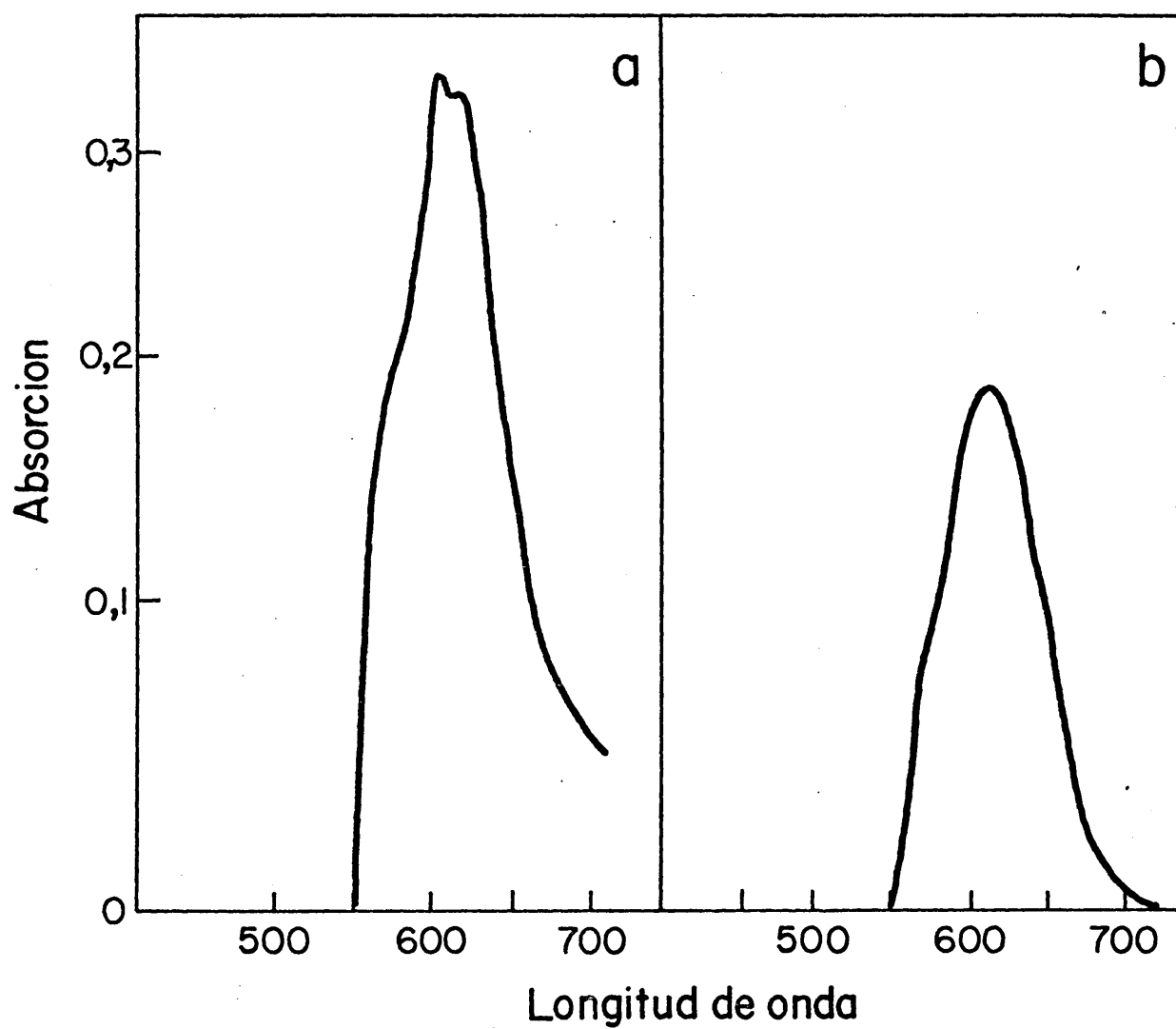


Fig. 34.- Espectros visibles de los complejos de colorante ácidos nucleicos de *B. subtilis* (a), y también de colorante polisacáridos de *P. aeruginosa* (b), frente a un blanco con reactivo coloreado.

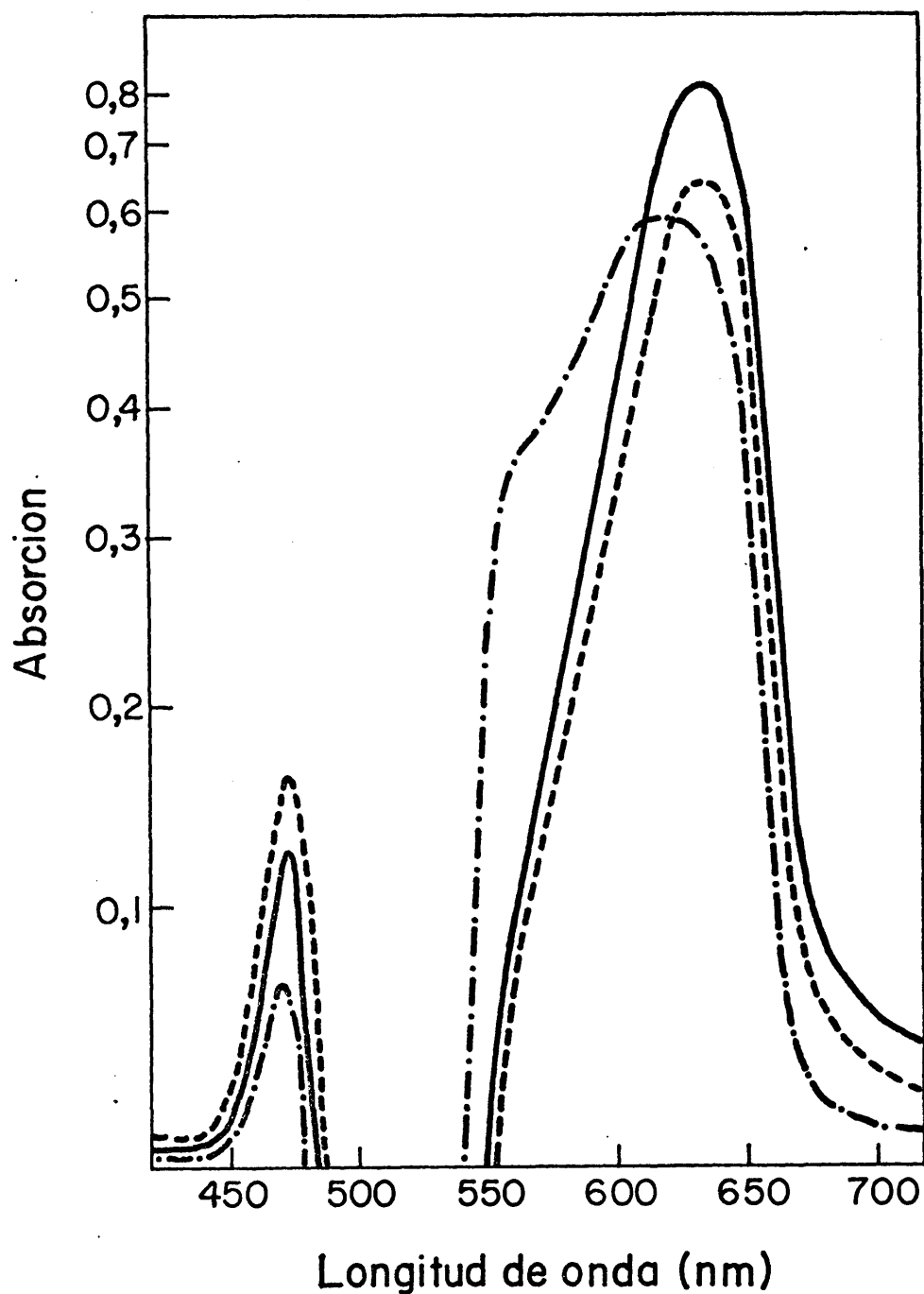


Fig. 35.- Espectros visibles de los complejos formados por el colorante con LPS crudo (fenol-agua, -.-), LPS purificado por ultrafiltración (—) y LPS purificado por ultrafiltración seguido de cromatografía en Sepharosa 4B (---) frente a un blanco con reactivo coloreado.

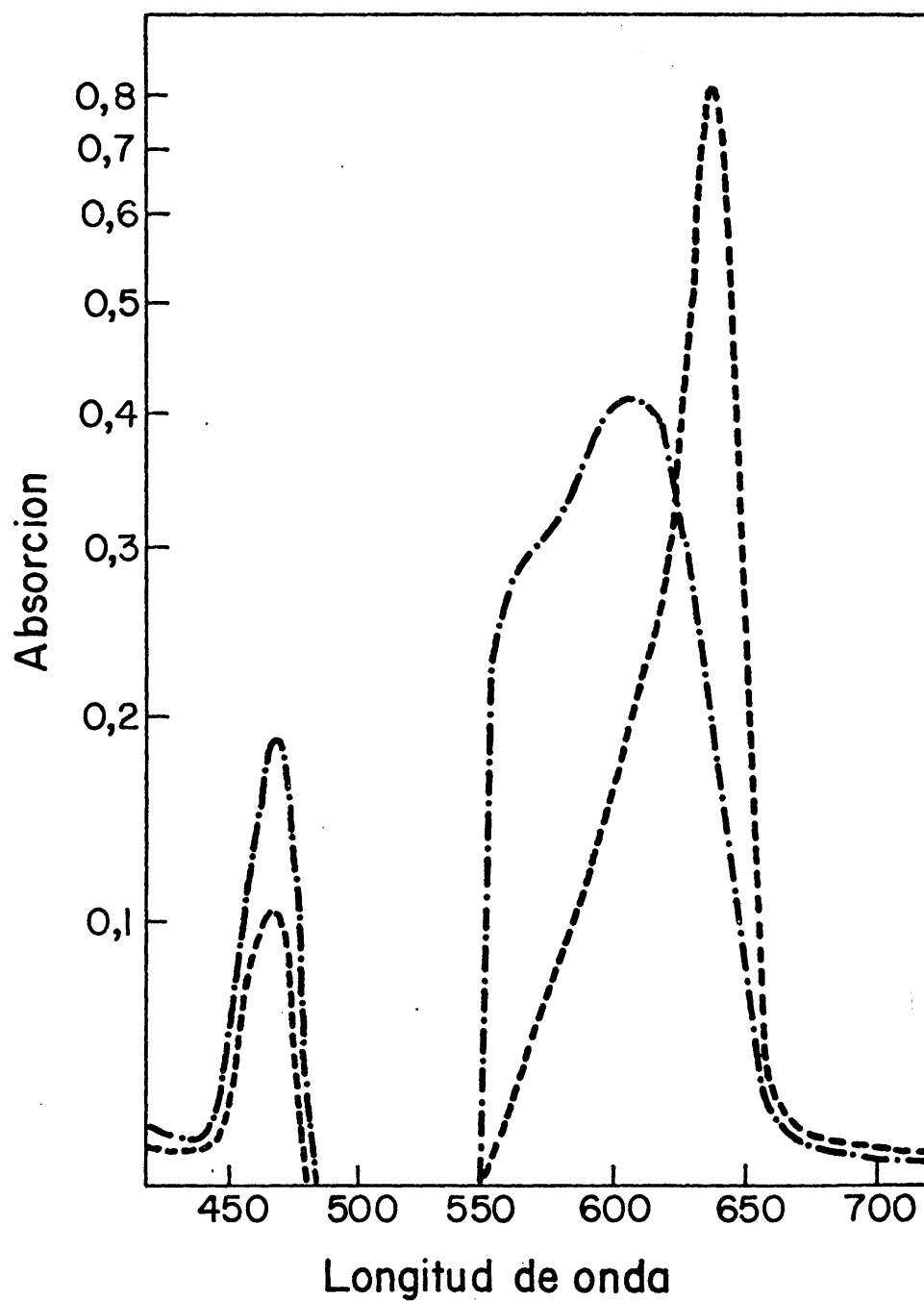


Fig. 36.- Espectros visibles de los complejos coloreados de LPS crudo (EDTA, - - - -) y purificado por cromatografía en Sepharosa 4B (· · · ·) frente a un blanco con colorante reactivo.

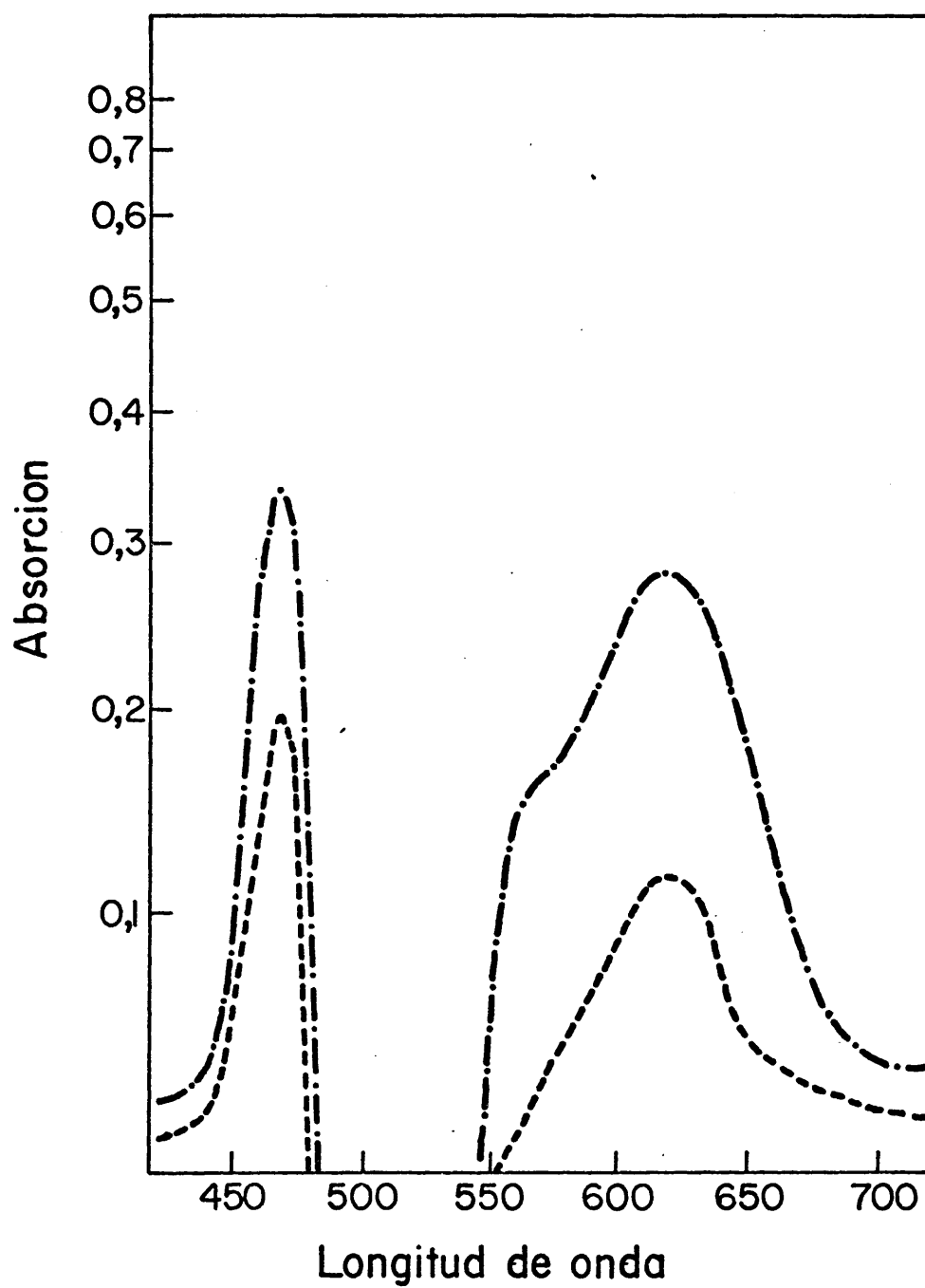


Fig. 37.- Espectros visibles de los complejos coloreados de LPS de B. melitensis (---) y del LPS de E. coli (-.-.-) frente a un blanco con el reactivo colorante.

30pg 3.1.199

A continuación determinamos la correspondencia entre la concentración de endotoxina y la intensidad de la absorción, tanto a 640 nm como a 470 nm; lo estudiamos sobre LPS de P. aeruginosa (EDTA y fenol-agua) y establecimos las correspondientes curvas de calibración (Fig. 38).

Por último, en la fig. 38 aparecen las curvas de calibración a 472 nm para el lipopolisacárido de E. coli. Este método colorimétrico demostró ser muy útil para la determinación de LPS a concentraciones comprendidas entre 5 y 30 μ g/ml, en la mezcla de reacción.

5. Morfología molecular del lipopolisacárido

Esta fue estudiada mediante algunos ensayos físico-químicos de tipo hidrodinámico y por observación directa al microscopio electrónico.

5.1. Características hidrodinámicas

Los perfiles de sedimentación obtenidos con los LPS de B. melitensis y P. aeruginosa aparecen en la Fig. 40. Como puede verse, el perfil obtenido en el caso del LPS de B. melitensis presenta un sólo pico bastante simétrico mientras que en el caso de P. aeruginosa el pico no resulta tan simétrico; lo que parece indicar que existe una cierta heterogeneidad. Los coeficientes de sedimentación extrapolados a partir de la zona lineal, a concentración 0 y corregidos frente a agua a 20° C, resultaron ser de 65S y 19S para los LPS de B. melitensis y P. aeruginosa, respectivamente (Fig. 41). Asimismo comprobamos que al aumentar la concentración disminuía el coeficiente de sedimentación, debido, seguramente, a alguna interacción entre las moléculas.

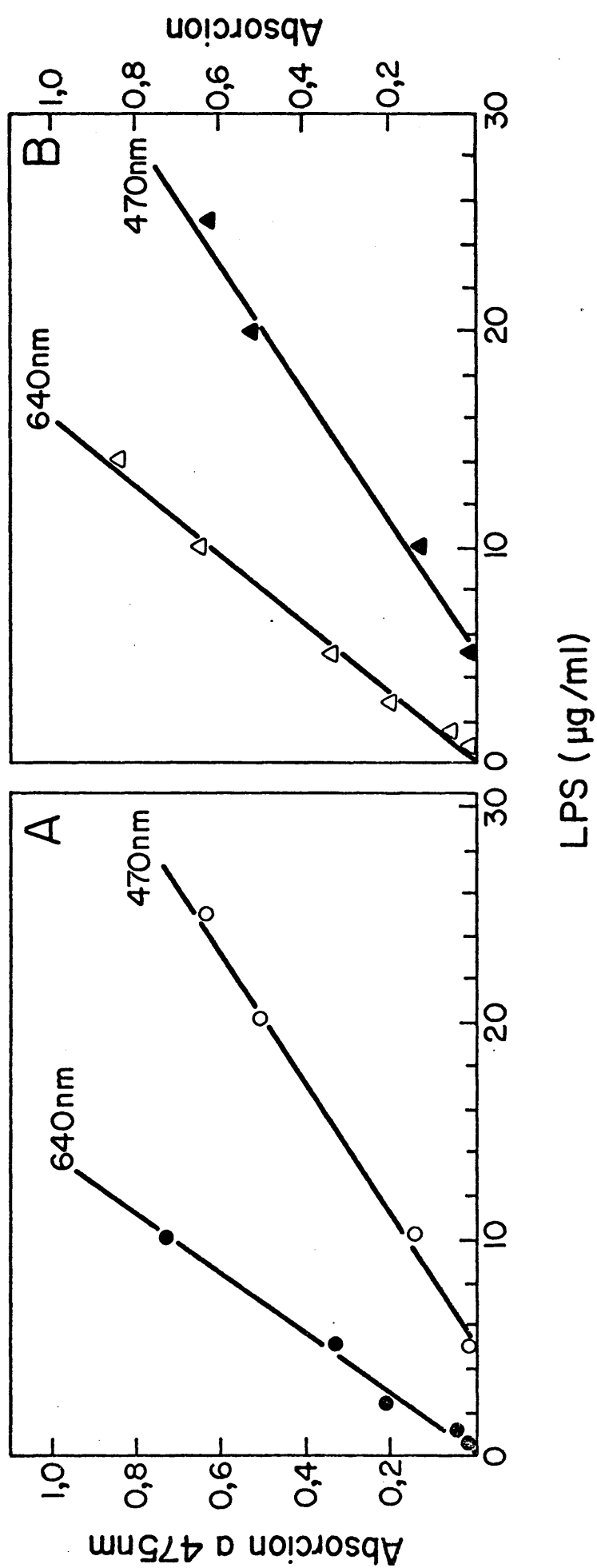


Fig. 38.- Efecto de la concentración de lipopolisacárido sobre la absorción a 472 nm y 640 nm del producto de reacción con el reactivo coloreado.
A, LPS de *P. aeruginosa* (EDTA); B, LPS de *P. aeruginosa* (Fenol-agua).

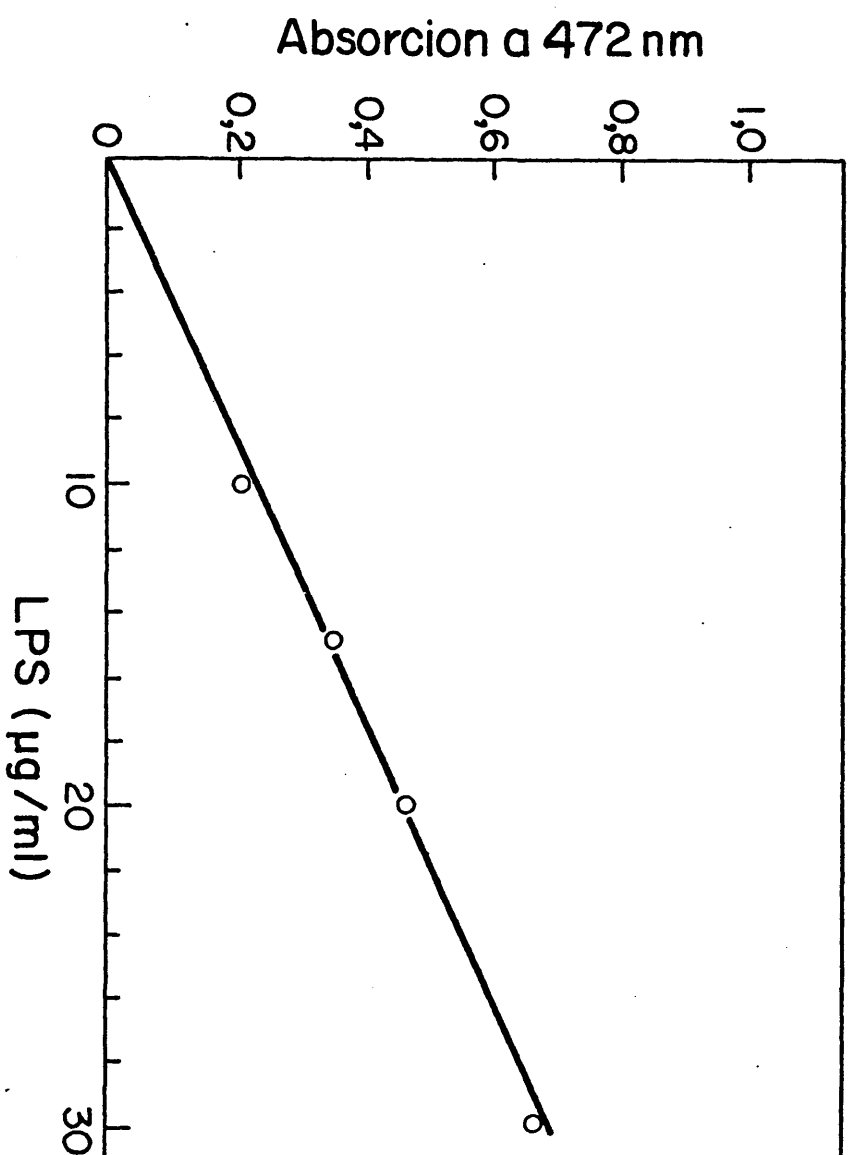


Fig. 39.- Efecto de la concentración del lipopolisacárido de E. coli sobre la absorción a 472 nm de sus productos de reacción con el reactivo coloreado.

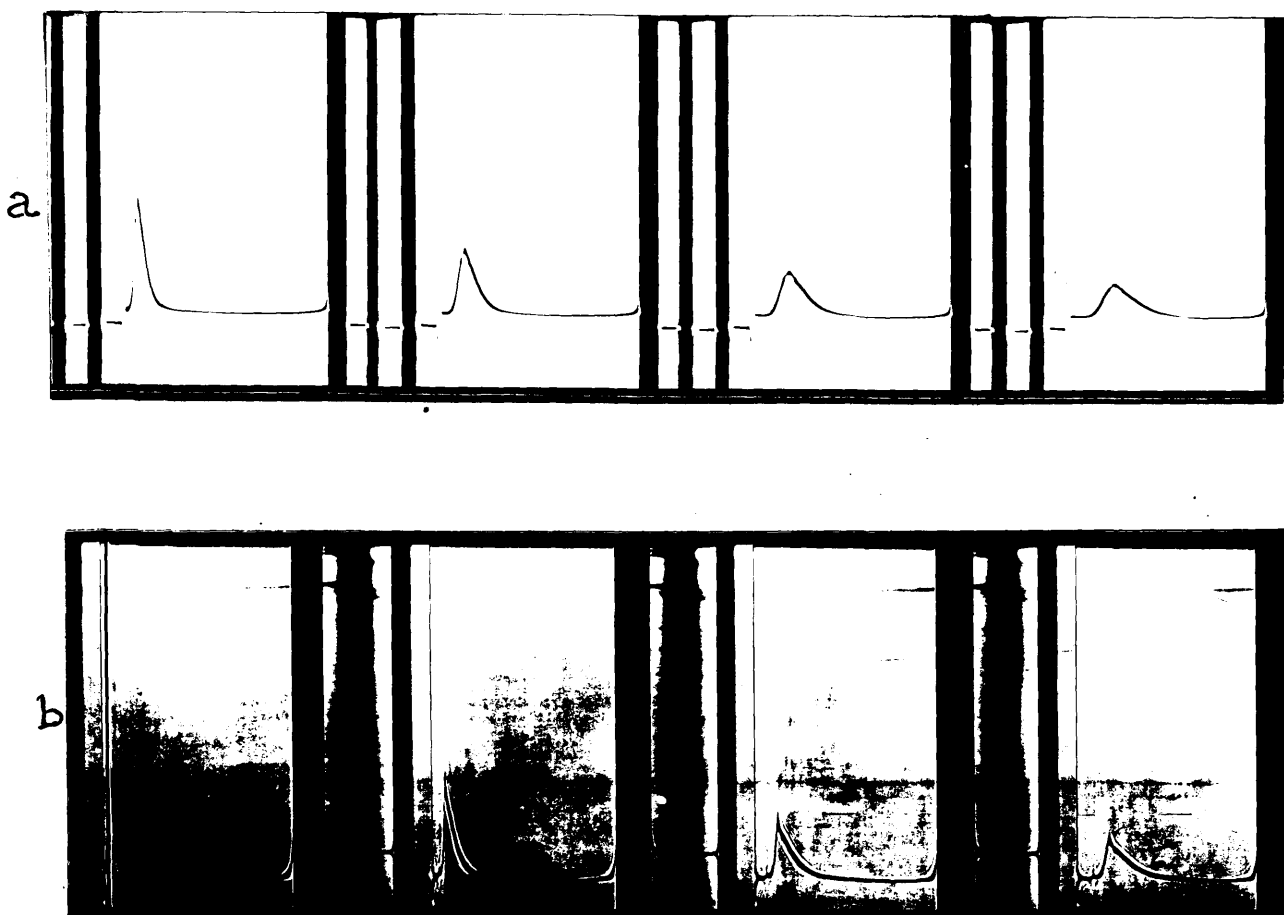


Fig. 40.- Comportamiento en ultracentrifuga analítica de los lipopolisacáridos de B. melitensis (a) y P. aeruginosa (b) a una concentración de 8 mg/ml y 10 mg/ml respectivamente.

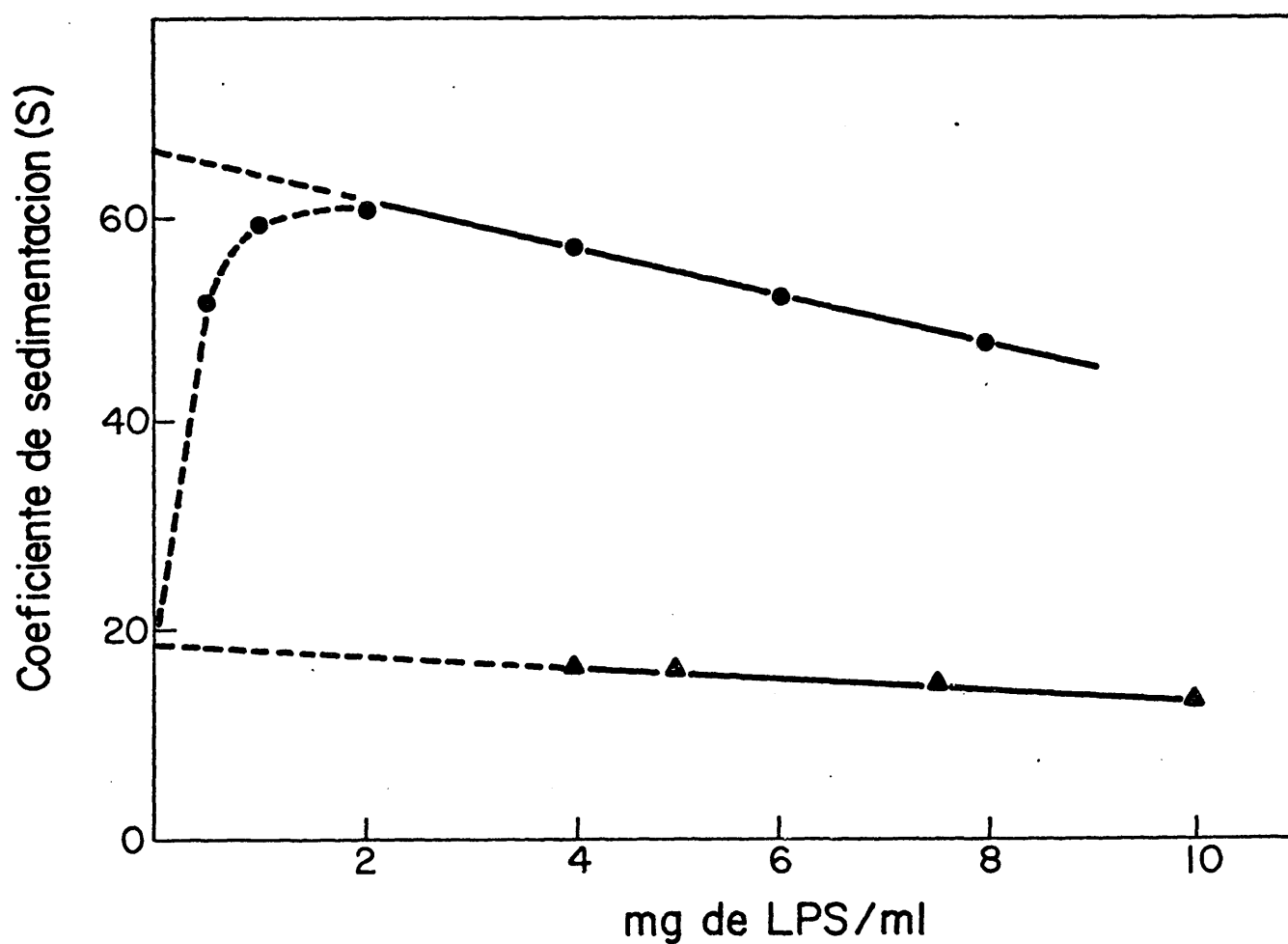


Fig. 41.- Dependencia entre los coeficientes de sedimentación observados y la concentración de los lipopolisacáridos.
(●—●), LPS B. melitensis; (▲—▲), LPS P. aeruginosa

que se sedimentan (VAN HOLDE, 1971). Sin embargo, para concentraciones inferiores a los 3 mg/ml -con LPS de *Brucella*- ocurre lo contrario, que al ir disminuyendo la concentración disminuye también el coeficiente de sedimentación; ésto podría indicar un proceso de disociación producido a bajas concentraciones, en el que la forma agregada da lugar a monómeros que originan tan sólo un pico con un coeficiente de sedimentación dependiente de la proporción de monómeros y polímeros. Cuando operamos con concentraciones mas elevadas se favoreció la aparición de la forma agregada aumentando el coeficiente de sedimentación. Por tanto, aunque los perfiles dieron únicamente un sólo pico, ésto no nos parece un criterio suficiente para afirmar la existencia de homogeneidad, por la ya comentada dependencia que existe con la concentración.

Cuando hicimos una extrapolación aproximada de la zona no lineal -a baja concentración de *Brucella*- vimos que el valor obtenido ($\approx 20 S$) era muy próximo al del LPS de *P. aeruginosa* y ello parece indicar que los tamaños básicos de los LPS endotóxicos de *Pseudomonas* y *Brucella* serían los mismos, existiendo únicamente diferencias en los niveles de agregación.

5.2. Estudio del LPS al microscopio electrónico

Según se puede comprobar en las Fig. 42 y 43 -mediante tinción positiva- los LPS de *B. melitensis* y *P. aeruginosa* aparecen como unas estructuras filamentosas con algunas ramificaciones, unas largas y otras muy cortas con aspecto globular; la proporción de estas últimas estructuras es mayor en

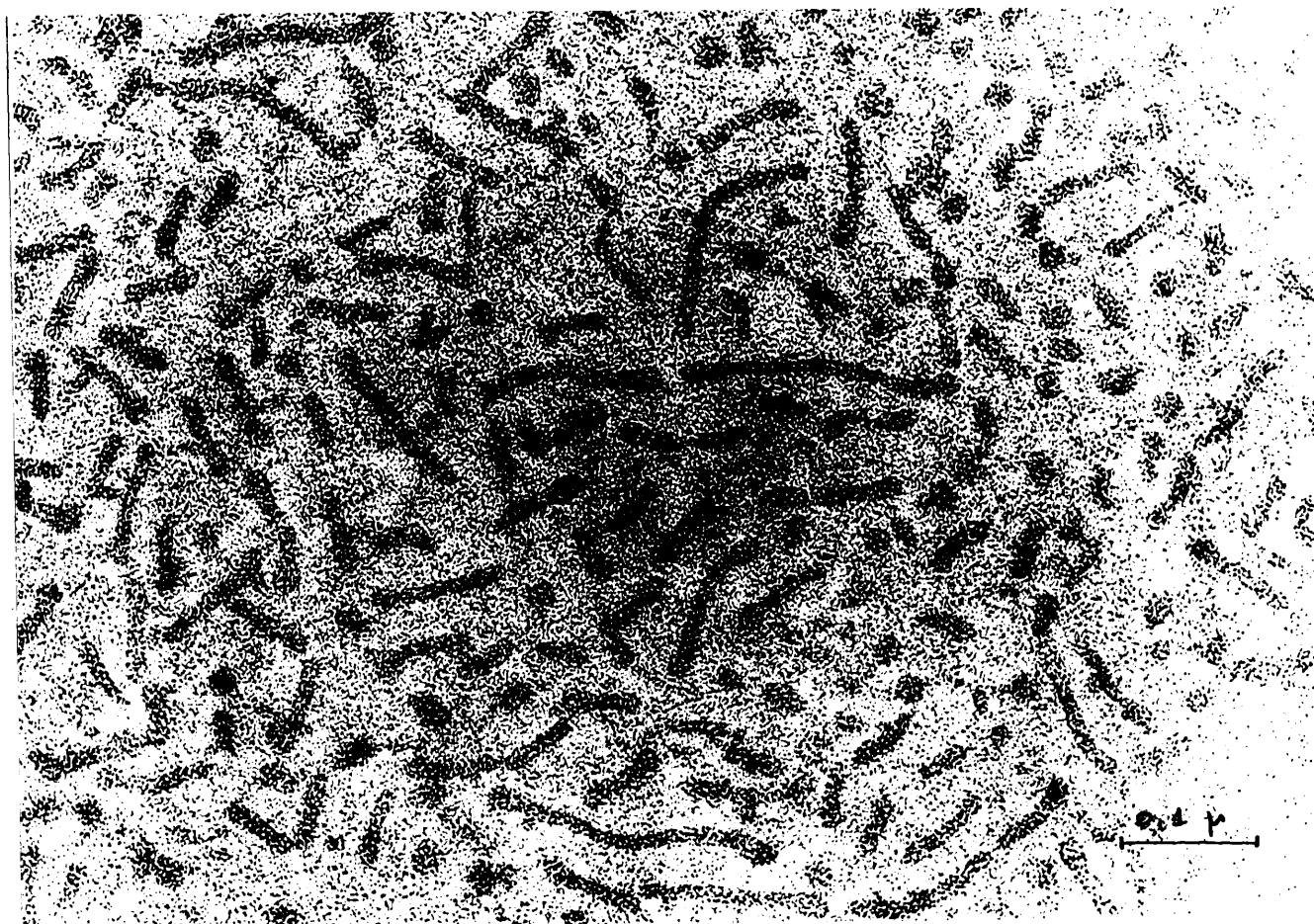


Fig. 42.- Electron-microfotografía del lipopolisacárido de *B. melitensis* con tinción de acetato de uranilo. El trazo indicador representa una longitud de 1000 Å

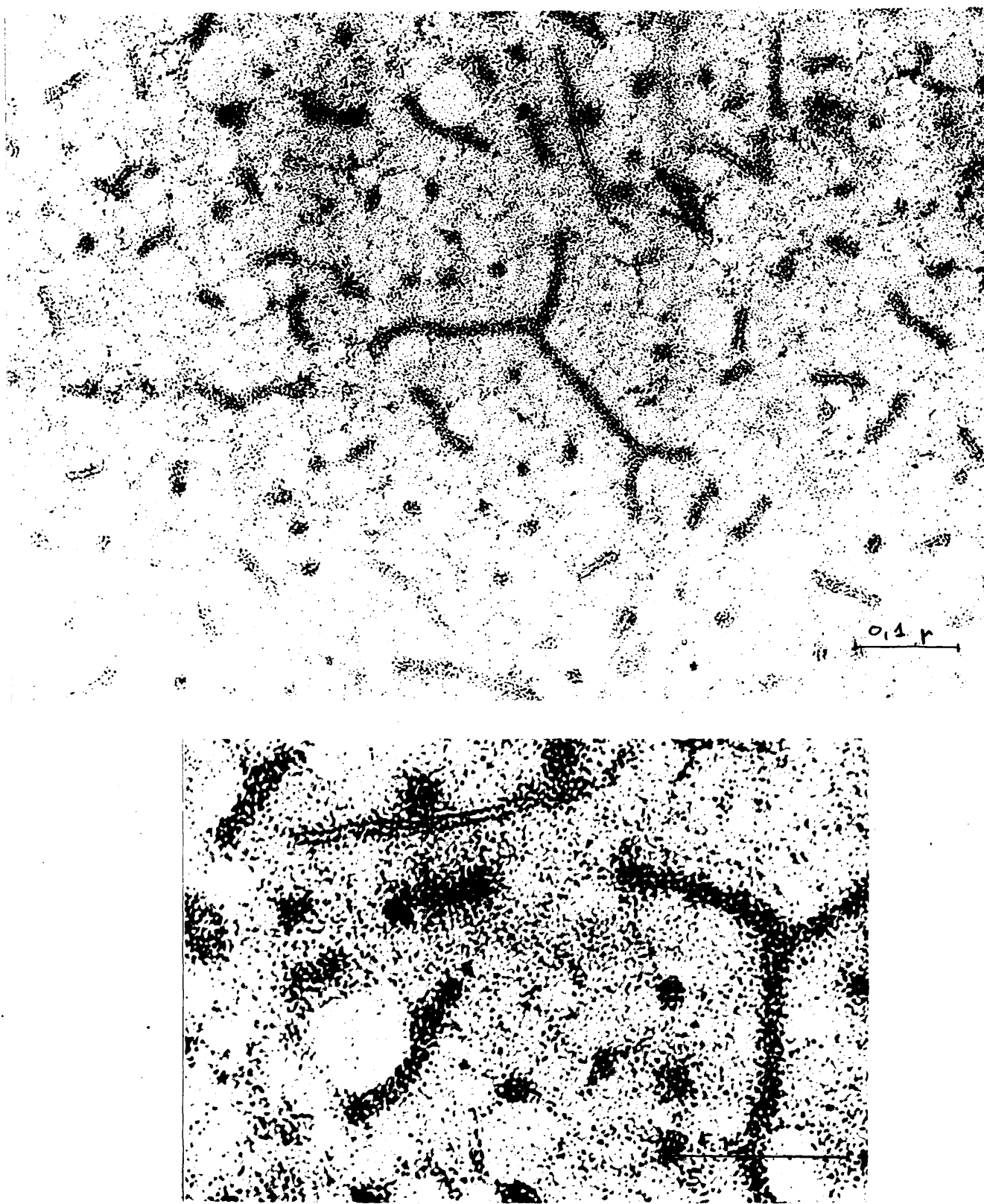


Fig. 43.- Electron-microfotografía del lipopolisacárido de P. aeruginosa con tinción de acetato de uranilo. El trazo indicador representa 1000 Å.

el caso del LPS de P. aeruginosa. En algunas ocasiones, las formas acíntadas presentan una región delimitada por dos líneas externas, paralelas, más densas.

Las muestras, previamente calentadas a 100° C durante 60 minutos, no muestran diferencias apreciables en el tamaño de partícula cuando se compara con la no calentada (Fig. 44). Los filamentos aparecen con un diametro de unos $110 \pm 20 \text{ Å}$ de ancho por 830 Å de largo; los que son más cortos, con una apariencia globular o vesicular, miden unos 160 Å de diametro.

En las figuras 45, 46, 47, 48 aparecen los LPS obtenidos a partir de B. melitensis y de P. aeruginosa después de practicar una tinción negativa. En este caso, la anchura de los filamentos es casi el doble que la observada cuando empleamos la tinción positiva. Apareció un nucleo central (sin teñir) a lo largo de todo el LPS, entre dos líneas paralelas. Existe también otra zona sin teñir -a ambos lados de estas líneas- que tiene bordes mas irregulares, siendo las dimensiones de la parte central de unos 80 Å y la de la que aparece a ambos lados de unos 90 Å , con un ancho total de $250 \pm 20 \text{ Å}$.

6. Propiedades biológicas

6.1. Pirogenicidad

Según indicamos en el apartado de Métodos, estos ensayos fueron de dos tipos: el clásico de inyección intravenosa a conejo y la "Prueba de Pyrogent"; con esta última intentamos una adaptación de carácter cuantitativo y para ello utilizamos varias series de concentraciones decrecientes de las distintas muestras sobre solución salina a pH 7. El cuadro VIII da idea de los resultados obtenidos con cuatro endotoxinas distintas

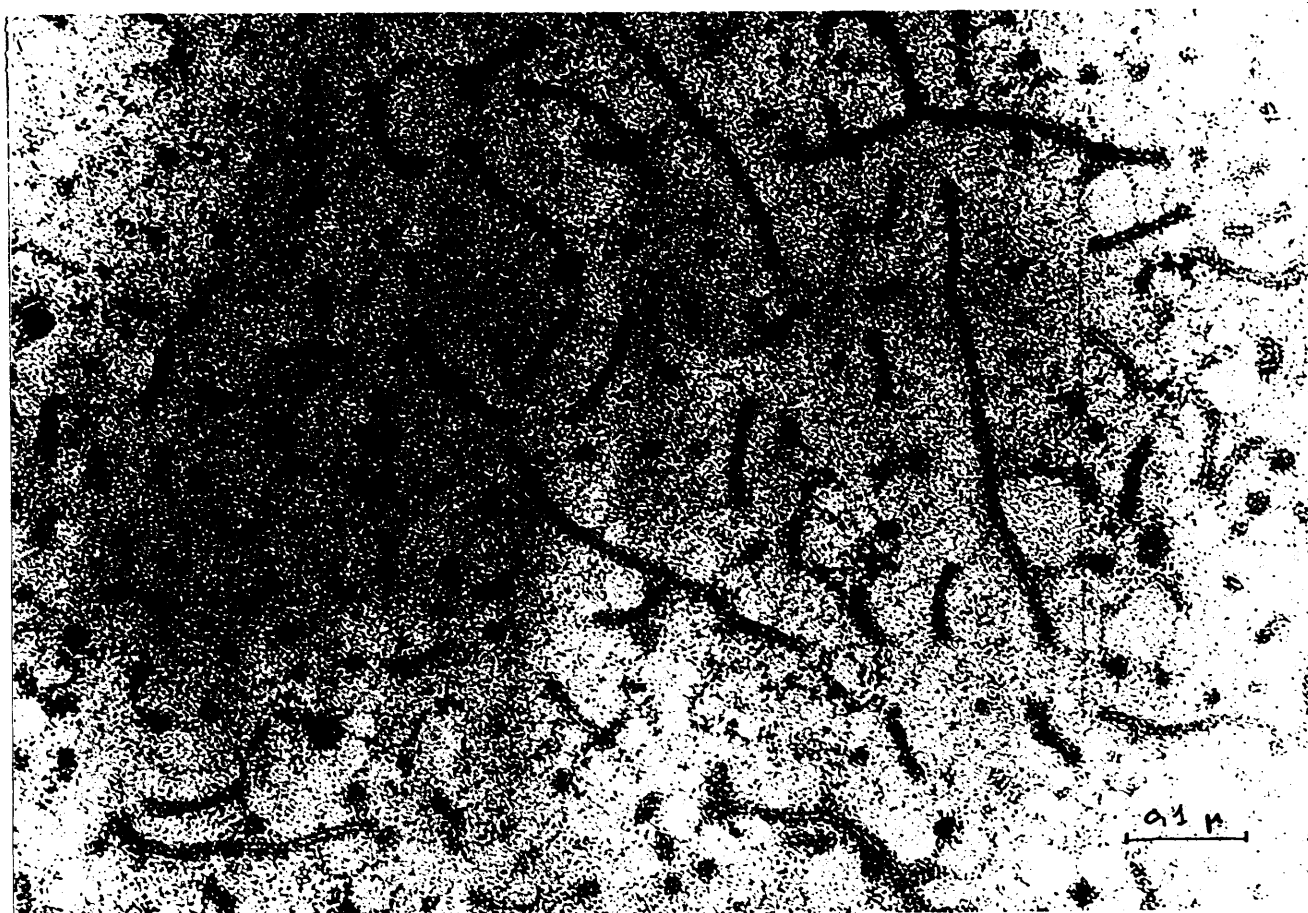


Fig. 44.- Electron-microfotografía del lipopolisacárido de P. aeruginosa calentado a 100° C durante 1 hora.

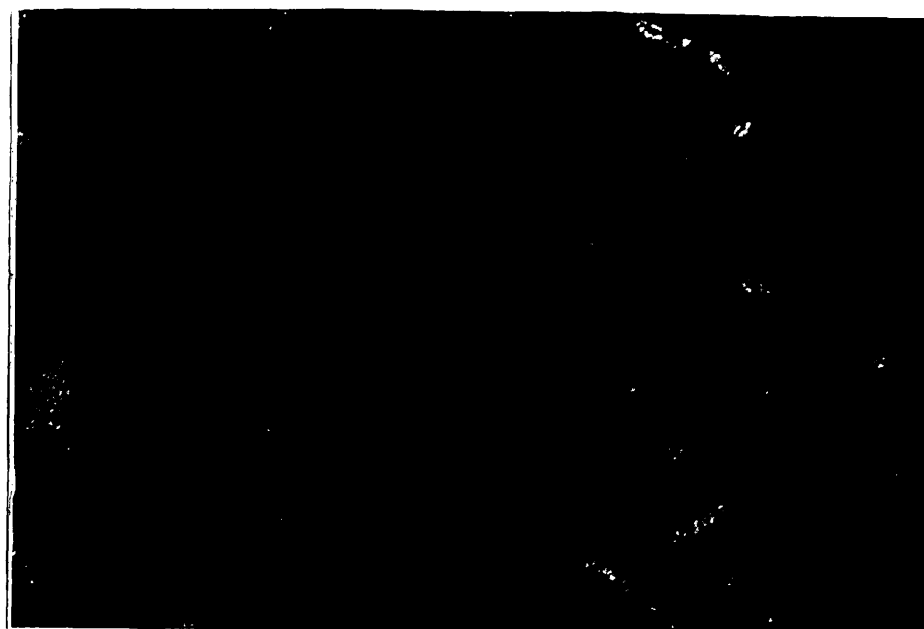


Fig. 45.- Electron-microfotografía del LPS de B. melitensis con tinción negativa.

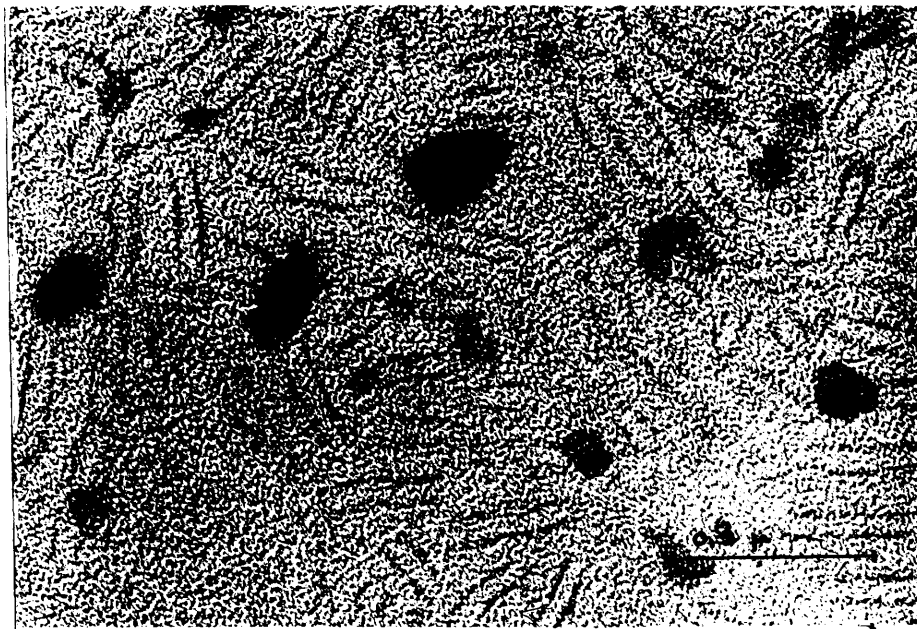


Fig. 46.- Electron-microfotografía del LPS de B. melitensis con tinción negativa.

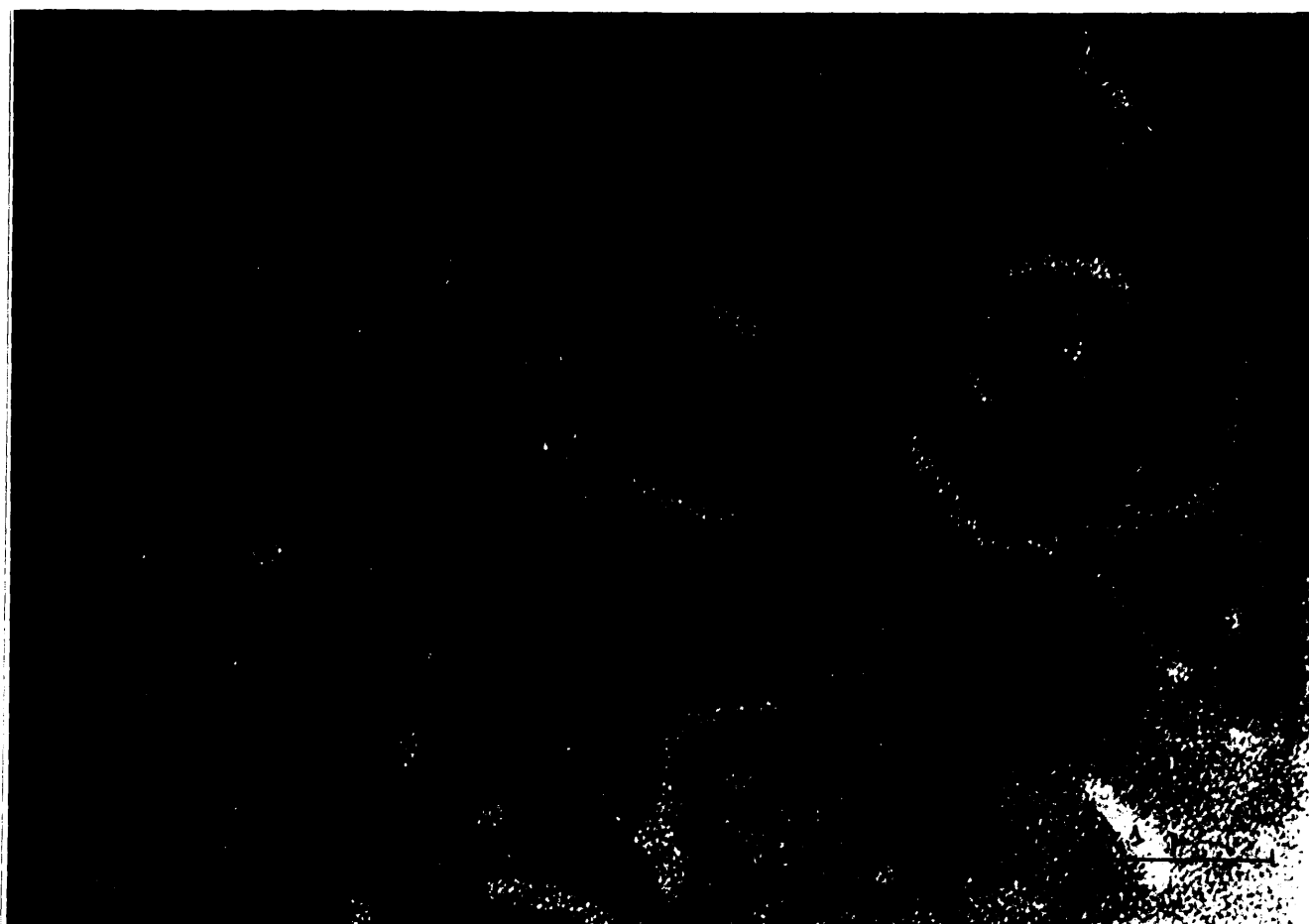


Fig. 47.- Electron-microfotografía del LPS de P. aeruginosa con tinción negativa.

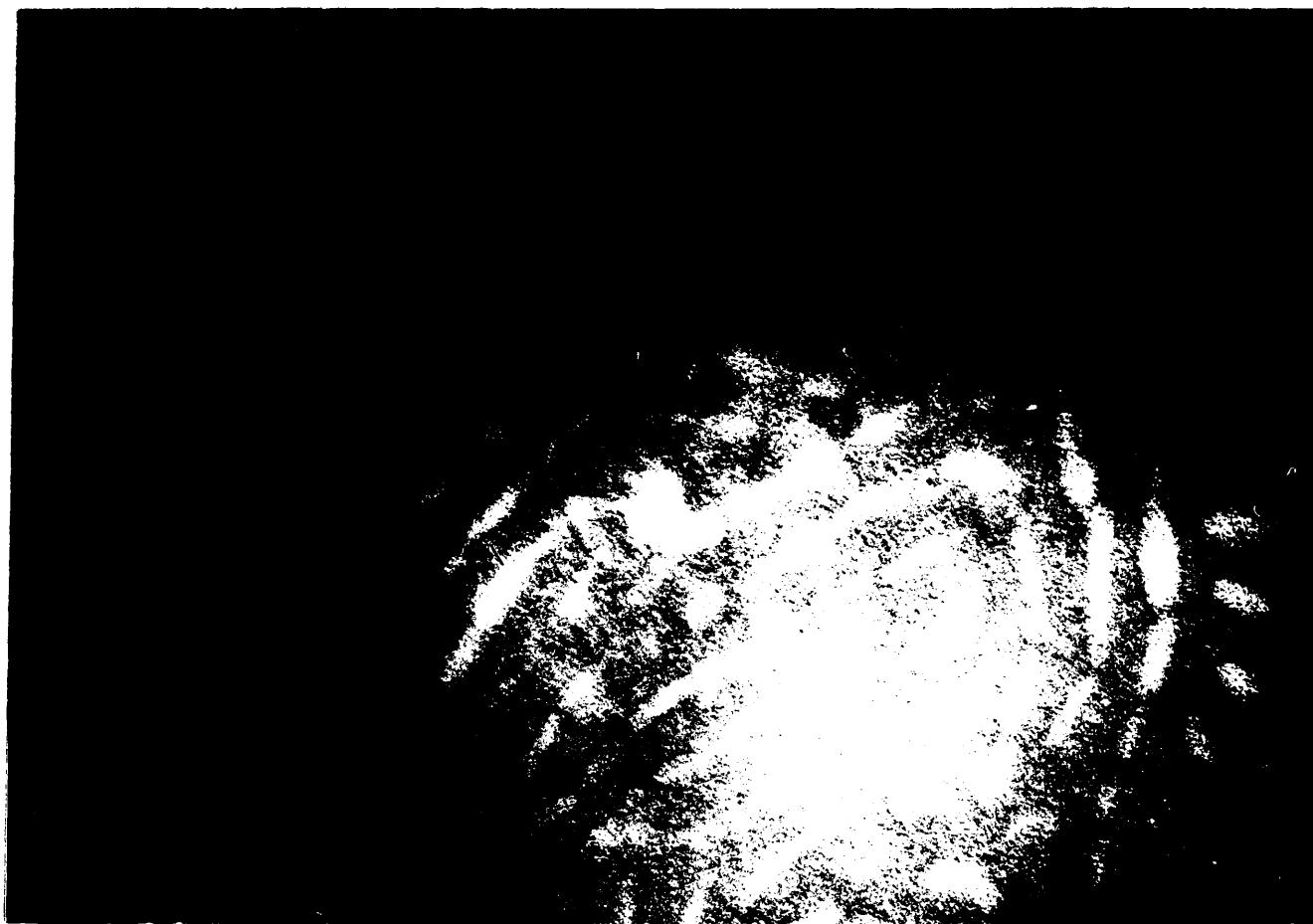


Fig. 48.- Electron-microfotografia del LPS de P. aeruginosa con tinción negativa.

CUADRO VIII-Variaciones en el grado de pirogenicidad de distintas endotoxinas, detectado mediante ensayos con lisados de amebocitos de Limulus polyphemus.

Muestras ensayadas	Resultados de la gelificación después de 60 minutos en contacto a 37° C con las concentraciones que se indican en $\mu\text{g/ml}$		
	0,5	0,05	0,005
LPS de <u>P.aeruginosa</u> (fenol-agua)	+	+	-
LPS de <u>P.aeruginosa</u> (EDTA)	+	±	±
LPS de <u>B. abortus</u>	+	+	-
LPS de <u>E. coli</u>	+	+	-
PS de <u>P. aeruginosa</u>	±	-	-
PS de <u>E. coli</u>	-	-	-
Control Pyrogen positivo	+	+	-
Control pyrogen negativo	-	-	-

y dos polisacaridos utilizados como comparación.

Como puede comprobarse, los tres LPS ensayados dieron idéntico comportamiento que el control Pyrogen-positivo, mientras que el LPS de P. aeruginosa (extraído con EDTA) tuvo un comportamiento algo diferente; los valores debilmente positivos (+) observados con el polisacarido de Pseudomonas quizá se deban a impurezas de endotoxina.

Por esta razón ensayamos comparativamente, mediante inyección intravenosa en conejo, las tres muestras procedentes de P. aeruginosa (LPS, fenol-agua), LPS (EDTA) y polisacáridos) para comprobar las variaciones de pirogenicidad por el método clásico. Utilizamos dos animales en cada caso, inyectando volúmenes de 1 ml/Kg de peso y cuya dosis pirogénica equivalía a 0,1 mg/Kg de peso disueltos en solución salina tamponada exenta de pirogenos; las oscilaciones de temperatura se anotaron según se indica en el cuadro IX.

Con el PS se obtuvieron algunas elevaciones de temperatura en los primeros 90 minutos, equivalentes a 0,25 unidades pirogénicas aproximadamente. La Fig. 49 nos dá una clara idea de las variaciones medias de temperatura en función del tiempo

6.2. Toxicidad

El grado de toxicidad de las distintas muestras fué determinado mediante el ensayo de letalidad en ratón. En el Cuadro X aparecen los valores de la DL50 obtenidos con las

CUADRO IX. Control del ensayo de pirógenos por inyección intravenosa en conejos

Muestra	Conejo	Peso	Colocación en la caja		Temperatura normal		Dosis		Maximo de temperatura en 3,5 h.	Unidades Pirogénicas
			n°	Hora	Hora a las 10	ml	hora			
LPS (EDTA)	1	3,2	1	9	39,6	3,2	10	41,8	2,2	
	2	3,5	2	9	39,3	3,5	10,05	41,4	2,1	
LPS (Fenol-agua)	3	3,7	3	9	39,5	3,7	10,10	41,2	1,7	
	4	3,6	4	9	39,7	3,6	10,15	41,2	1,5	

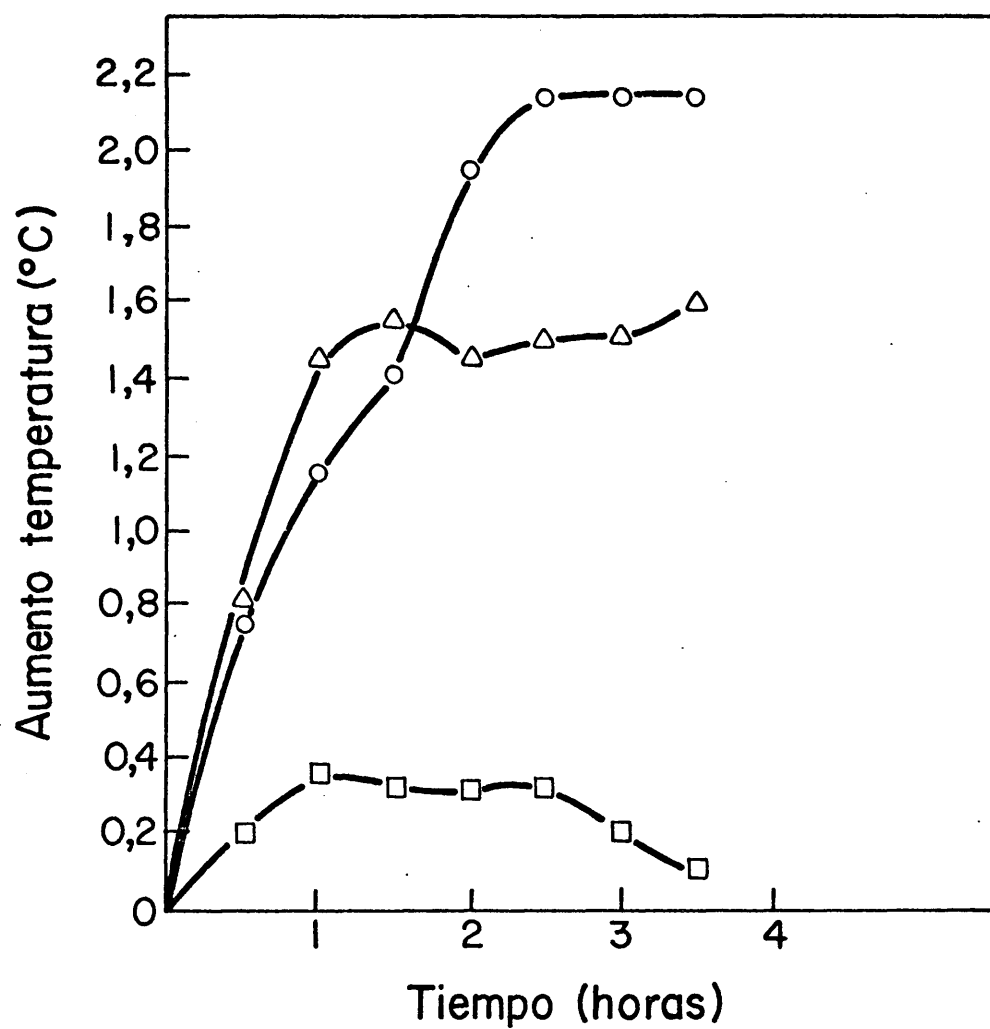


Fig. 49.- Variaciones medias de la temperatura, en función del tiempo, producidos por la inyección intravenosa de LPS (EDTA, $\circ-\circ$) LPS (fenol-agua, $\triangle-\triangle$) y polisacáridos ($\square-\square$) todos ellos de P. aeruginosa

CUADRO X .- Valores de DL₅₀ encontrados para las distintas muestras endotóxicas estudiadas.

Endotoxina	DL ₅₀ μg/ratón (*)	DL ₅₀ mg/Kg
<u>P.aeruginosa</u> (fenol-agua)	410	20,5
<u>P.aeruginosa</u> (EDTA)	340	17
<u>B.melitensis</u>	360	18
<u>Y.enterocolitica</u>	300	15
<u>B. abortus</u>	350	17,5
<u>E. coli</u>	300	15

✱

Los animales pertenecían a lotes de la misma edad y su peso era de 20 ± 1 gr.

distintas endotoxinas y como puede comprobarse, los resultados obtenidos fueron muy similares en todos los casos.

7. Actividades Immunobiológicas

7.1. Mitogénesis

Como puede verse en el capítulo de Métodos ésta actividad biológica se ensayó midiendo el grado de estimulación en la incorporación de timidina.

En la Fig. 50 aparecen los resultados que se obtienen al incubar células de bazo de ratón con distintas dosis de LPS de B. melitensis y P. aeruginosa. En estas experiencias el LPS procedente de P. aeruginosa produjo unos niveles de estimulación, en la incorporación de ^3H -Timidina, que resultaron algo mayores que los obtenidos con el LPS de B. melitensis. La concentración óptima para el LPS de P. aeruginosa fue de $10\ \mu\text{g/ml}$ y de $100\ \mu\text{g/ml}$ para el de B. melitensis.

Por otra parte, en la Fig. 51 se representan los resultados obtenidos al utilizar -con propósitos comparativos- otros mitógenos tales como el sulfato de dextrano (para linfocitos B), la concanavalina A y la fitohemaglutinina (linfocitos T).

Las dosis de máxima estimulación se consiguieron con 50, 5 y $10\ \mu\text{g/ml}$, para dextrano, concanavalina A y fitohemaglutinina, respectivamente.

A continuación, realizamos una cinética de incorporación de ^3H -Timidina en células de bazo que eran activadas con

una concentración óptima de mitógeno calculada previamente. Así, en la Fig. 52 se puede observar que la máxima estimulación ocurre al segundo día de cultivo, cuando se trata del LPS de P. aeruginosa o del de B. melitensis, mientras que con la concanavalina A, este máximo fue alcanzado el tercer día de cultivo en idénticas condiciones.

7.2. Capacidad hipersensibilizante

Esta propiedad fue ensayada en ratones, mediante la prueba del shock anafiláctico producido por inyección intravenosa de 10 μ g de endotoxina en animales previamente hipersensibilizados por una dosis intradérmica del mismo material, administrado una semana antes. En estas condiciones se ha podido comprobar que el LPS de P. aeruginosa, a diferencia del de B. melitensis, no posee esta capacidad hipersensibilizante.

7.3. Inmunogénesis

La respuesta humoral primaria frente al LPS de P. aeruginosa, administrado en dosis única intraperitoneal ha sido estudiado en ratones machos suizos de la raza Ham/ICR. En el cuadro XI aparece el efecto que, la dosis administrada, tiene sobre la respuesta de anticuerpos humorales, según fue comprobado por ensayos de inmunoprecipitación de Ouchterlony. Se demostró que las dosis de antígeno muy altas, así como las muy bajas, dan lugar a una respuesta humoral mas débil o en algunos casos retrasada. Con la dosis de 50 μ g por ratón, no se obtuvieron niveles de inmunización detectables para este tipo de ensayo.

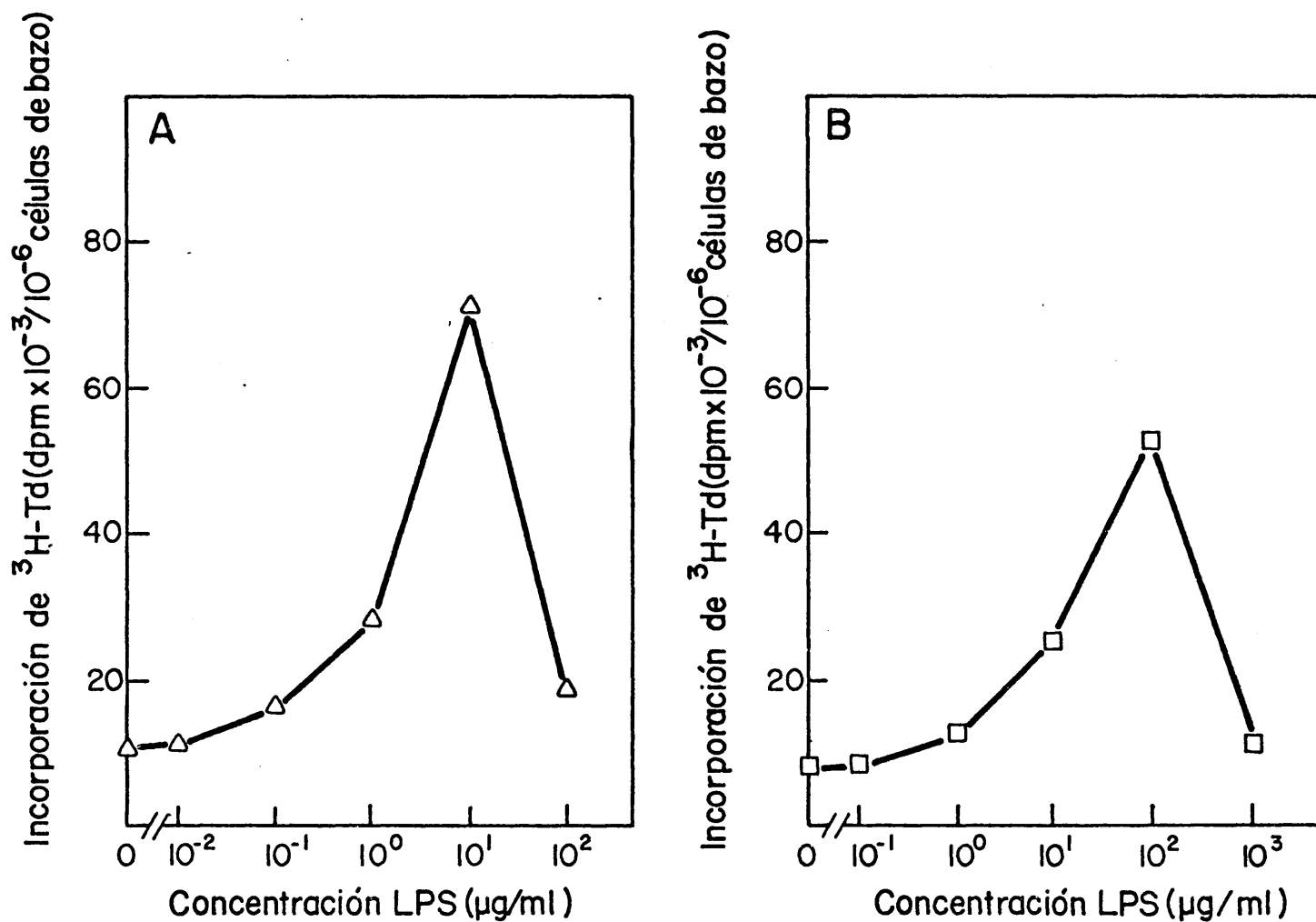


Fig. 50.- Estimulación de la síntesis de DNA en células de bazo de ratón, medida como incorporación de ^3H -Timidina con distintas dosis de LPS de P. aeruginosa (A) y B. melitensis (B). Cada punto es media de tres cultivos.

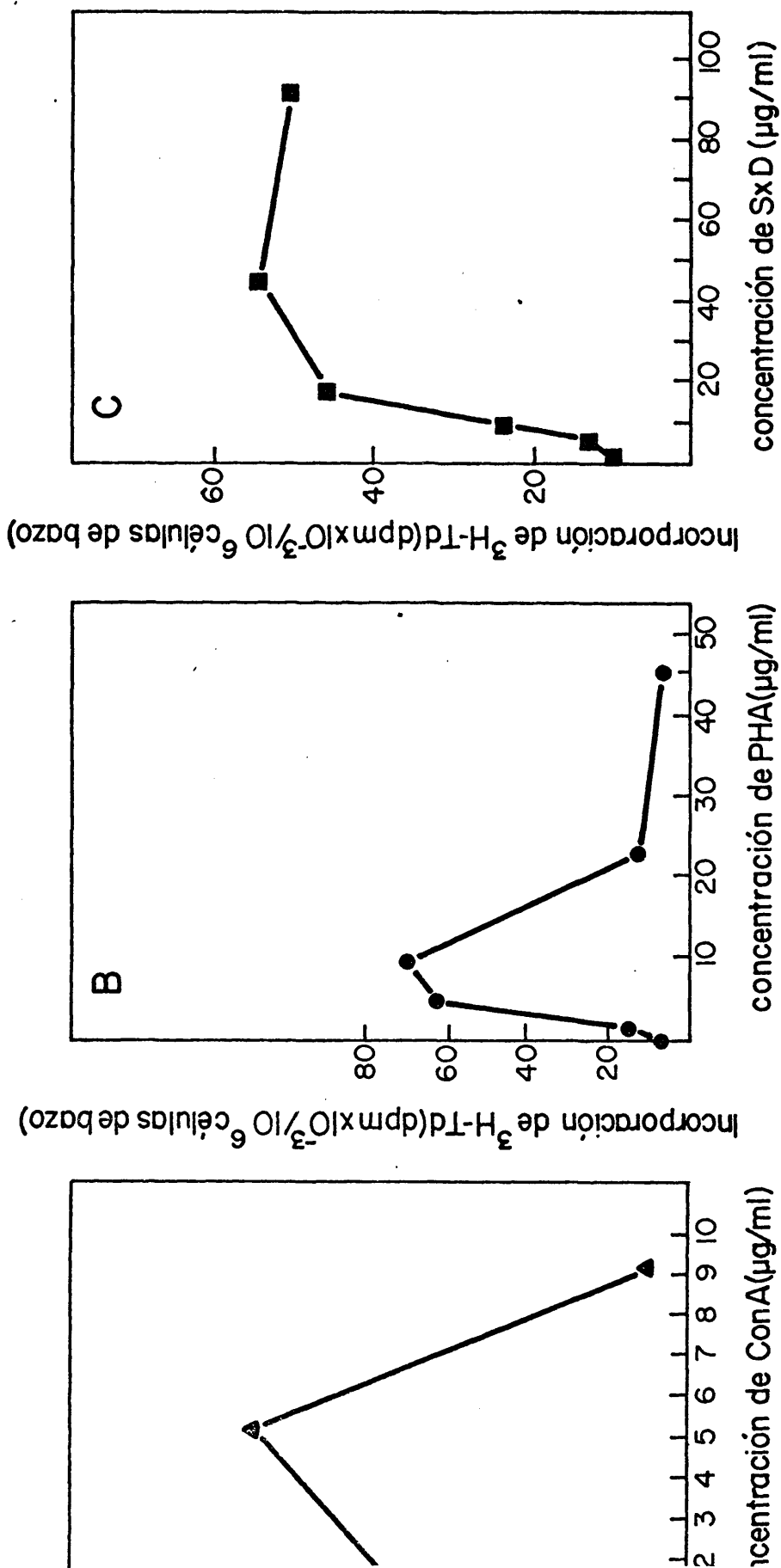


Fig. 51.- Estimulación de la síntesis de DNA en células de bazo de ratón, medida como incorporación de ^3H -Timidina, con distintas dosis de Concanavalina A (A), Fitohemaglutinina (B) y sulfato de dextrano (C).

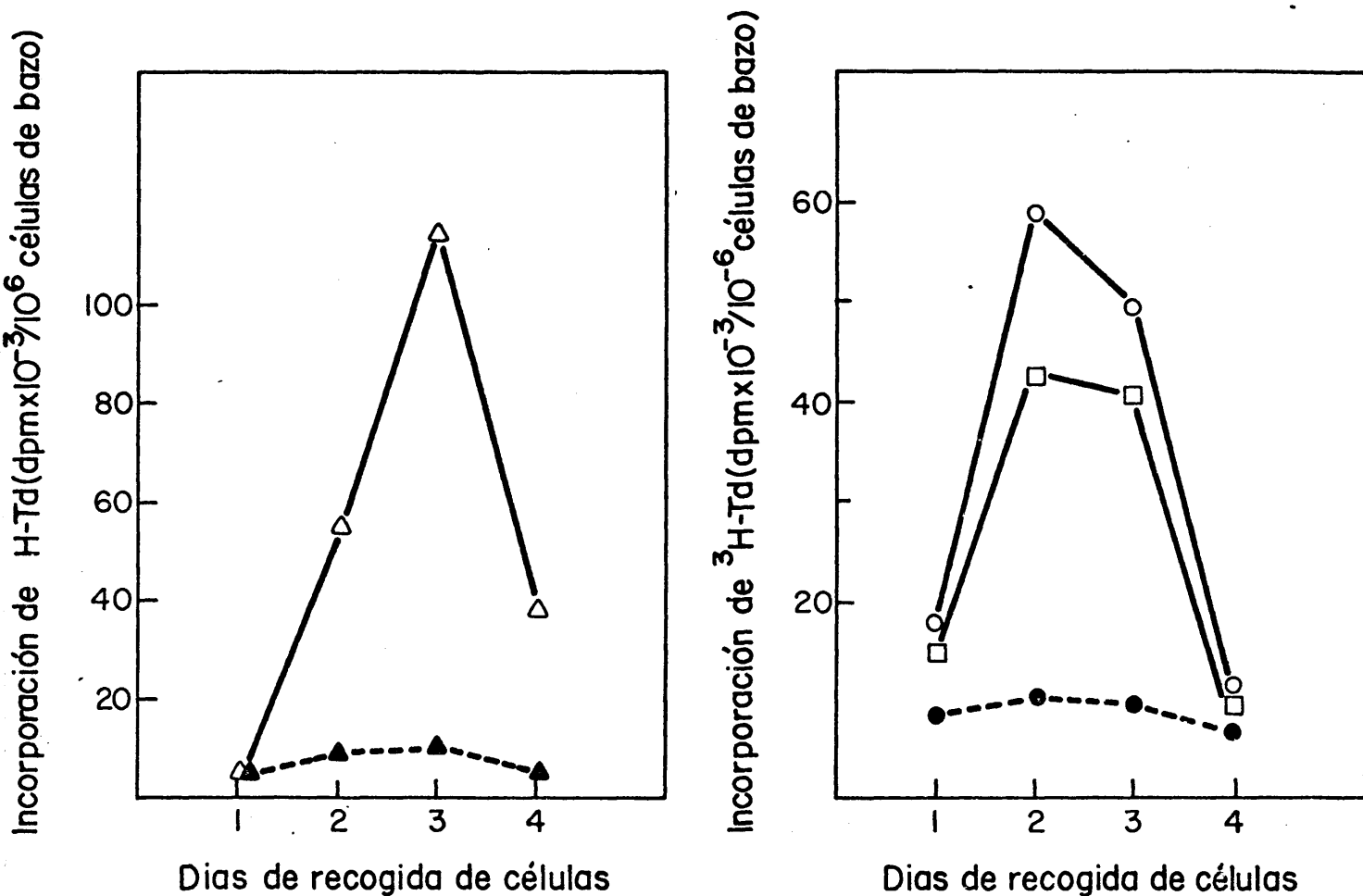


Fig. 52.- Cinética de las respuestas de células de bazo estimuladas con 5, 10 y 100 μ g/ml de Convanavalina A (Δ - Δ) LPS de *P. aeruginosa*, (\circ - \circ) y de *B. melitensis* (\square - \square) respectivamente (\blacktriangle - \blacktriangle) y (\bullet - \bullet) controles sin mitógenos.

CUADRO XI .- Variaciones de la inmunorespuesta humoral de ratones frente a endotoxina de P. aeruginosa, en dosis únicas, inyectadas intraperitonealmente.

Dosis	Niveles de precipitinas encontrados en los distintos intervalos después de la inyección de antígeno.				
	6	9	11	13 (días)	
10 μ g/ratón	0	0	-	-	
15 μ g/ratón	1/2	1/2	-	1/2	
25 μ g/ratón	1/2	1/2	1/2	0	
30 μ g/ratón	1/4	1/2	1/4	1/4	
40 μ g/ratón	0	1/2	-	1	
50 μ g/ratón	0	0	0	0	
100 μ g/ratón	0	1	0	-	
250 μ g/ratón	0	0	1/8	1/8	
500 μ g/ratón	0	1/4	1/2	1/2	

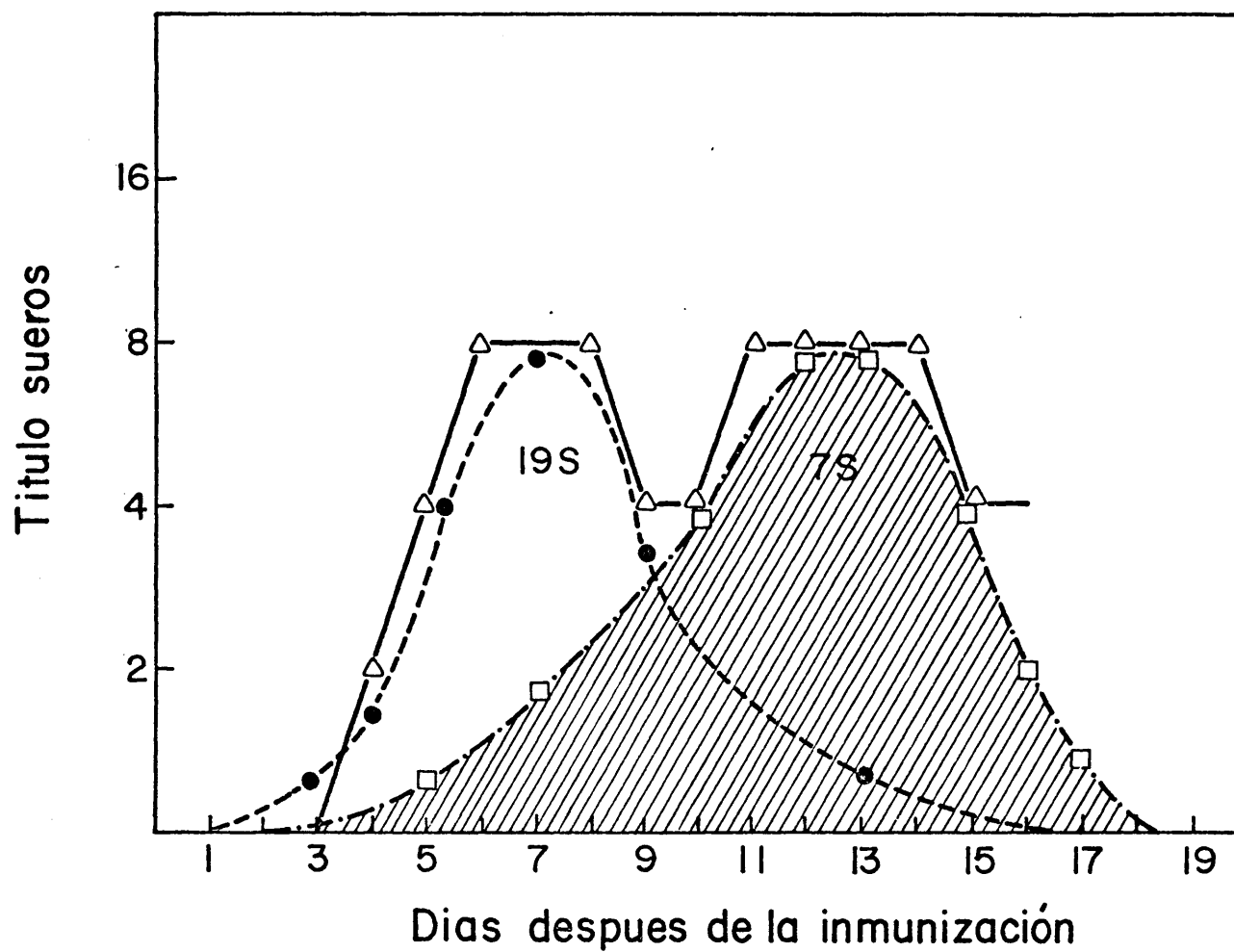


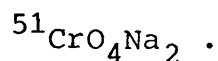
Fig. 53.- Dinámica de la immuno-respuesta primaria, en ratón, frente a 30 μ g de endotoxina de *P. aeruginosa* por vía i.p.

Dado que los datos obtenidos con dosis de 30 μ g nos parecieron las más interesantes, realizamos un estudio más completo de la dinámica de producción de anticuerpos humorales en dichas condiciones. Así, en la Fig. 53 aparecen los resultados obtenidos en el ensayo de inmunoprecipitación de Ouchterlony.

Como puede verse, la respuesta en anticuerpos humorales presentaba dos máximos: uno que aparece hacia el séptimo día después de la inyección de antígeno y otro alrededor del día 12.

Los LPS de P. aeruginosa se analizaron por inmunolectroforesis e inmunodifusión frente a sueros de conejos inmunizados. En la Fig. 54 aparece un diagrama de la línea de precipitación que se produce cerca del pocillo con antígeno por inmunolectroforesis y una fotografía de una inmunoprecipitación de Ouchterlony.

Dado que los títulos séricos alcanzados por éste método de inmunoprecipitación eran muy bajos quisimos estudiar el fenómeno mediante el empleo de técnicas mas sensibles y para ello acudimos a ensayos de hemaglutinación pasiva y a otra todavía mas sensible aún, como es la de inmunohemólisis de eritrocitos sensibilizados con el LPS específico y marcados con



Antes de ello, en este último caso, hubimos de fijar las condiciones normales de ensayo para nuestras posibilidades y para ello ensayamos las variaciones condicionadas por el tipo de hematies (ratón o carnero), el grado de incorporación del

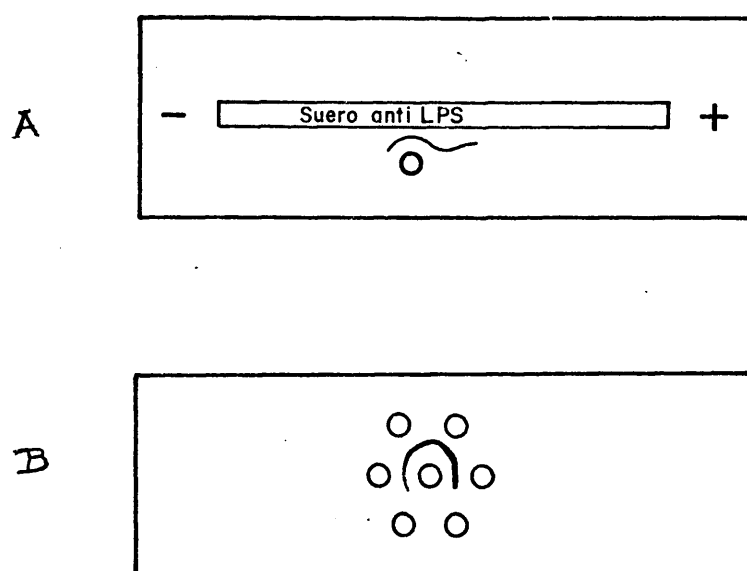


Fig. 54.- Diagrama de las líneas de precipitación producidas en la inmuno-electroforesis del LPS de P. aeruginosa con el antisuero (A) y una placa de inmunoprecipitación de este LPS frente a su antisuero específico.

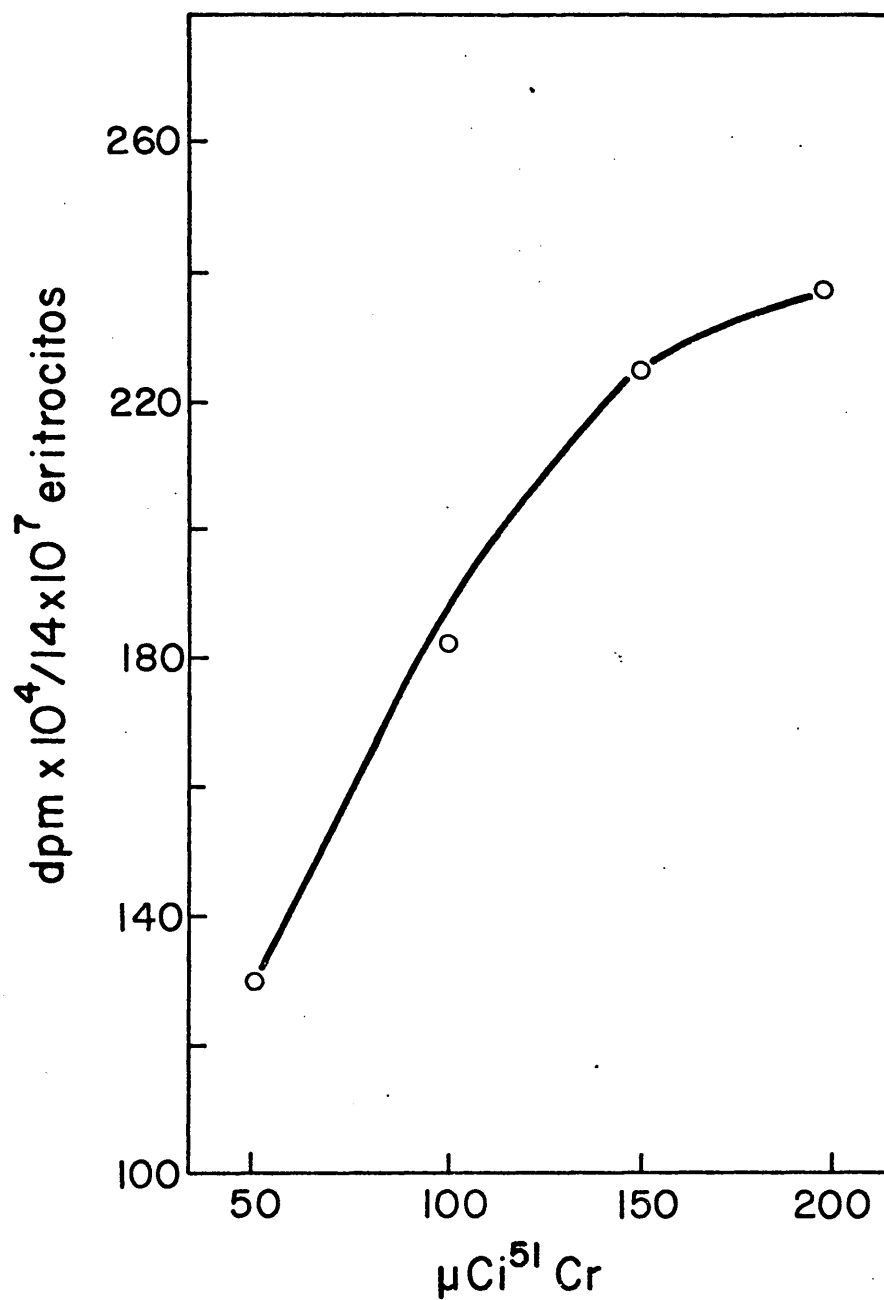


Fig. 55.- Marcado de hematies de ratón con actividades crecientes de ^{51}Cr .

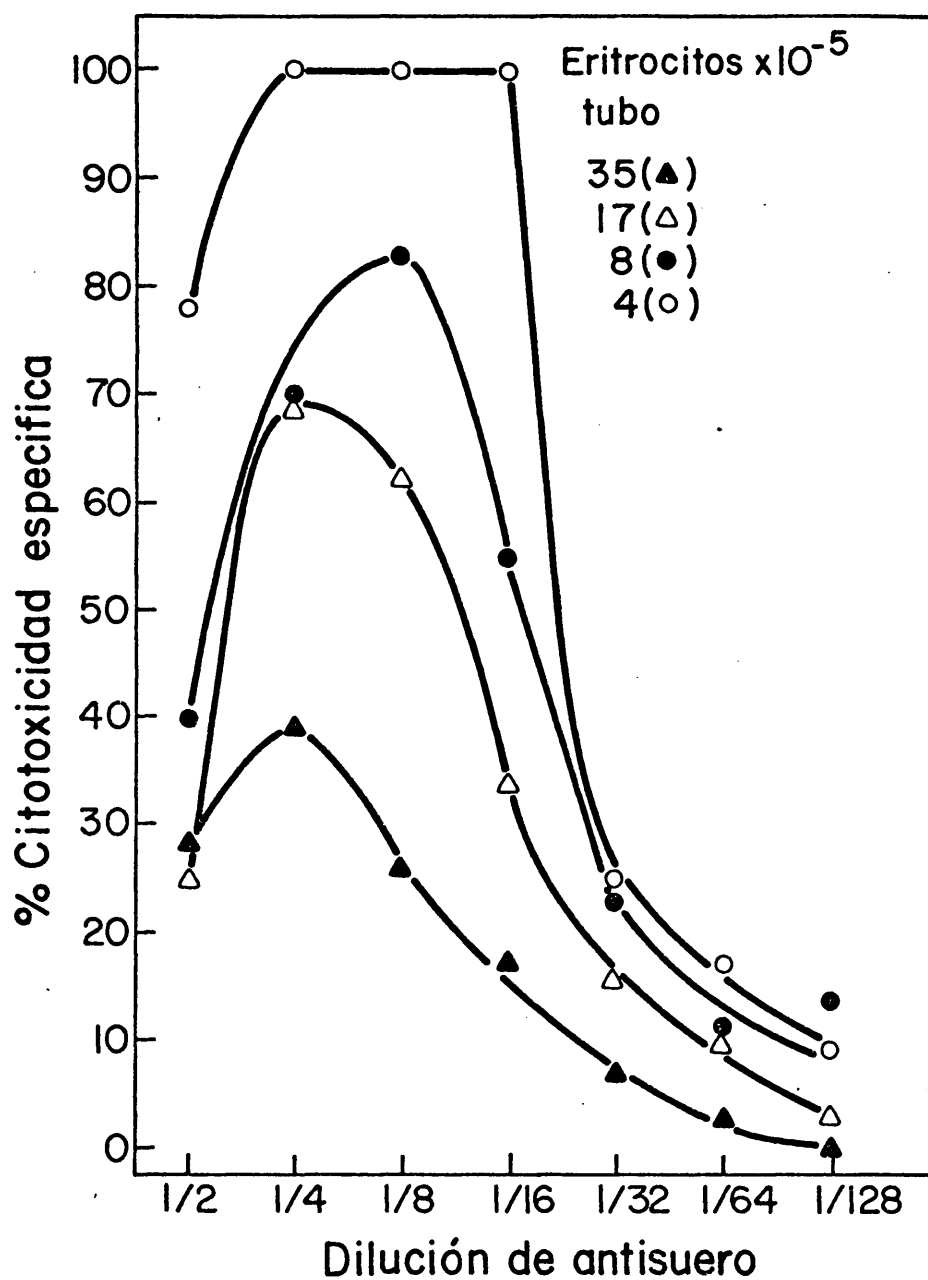


Fig. 56.- Efecto de la concentración de hemáties de ratón en el ensayo de inmunohemolisis.

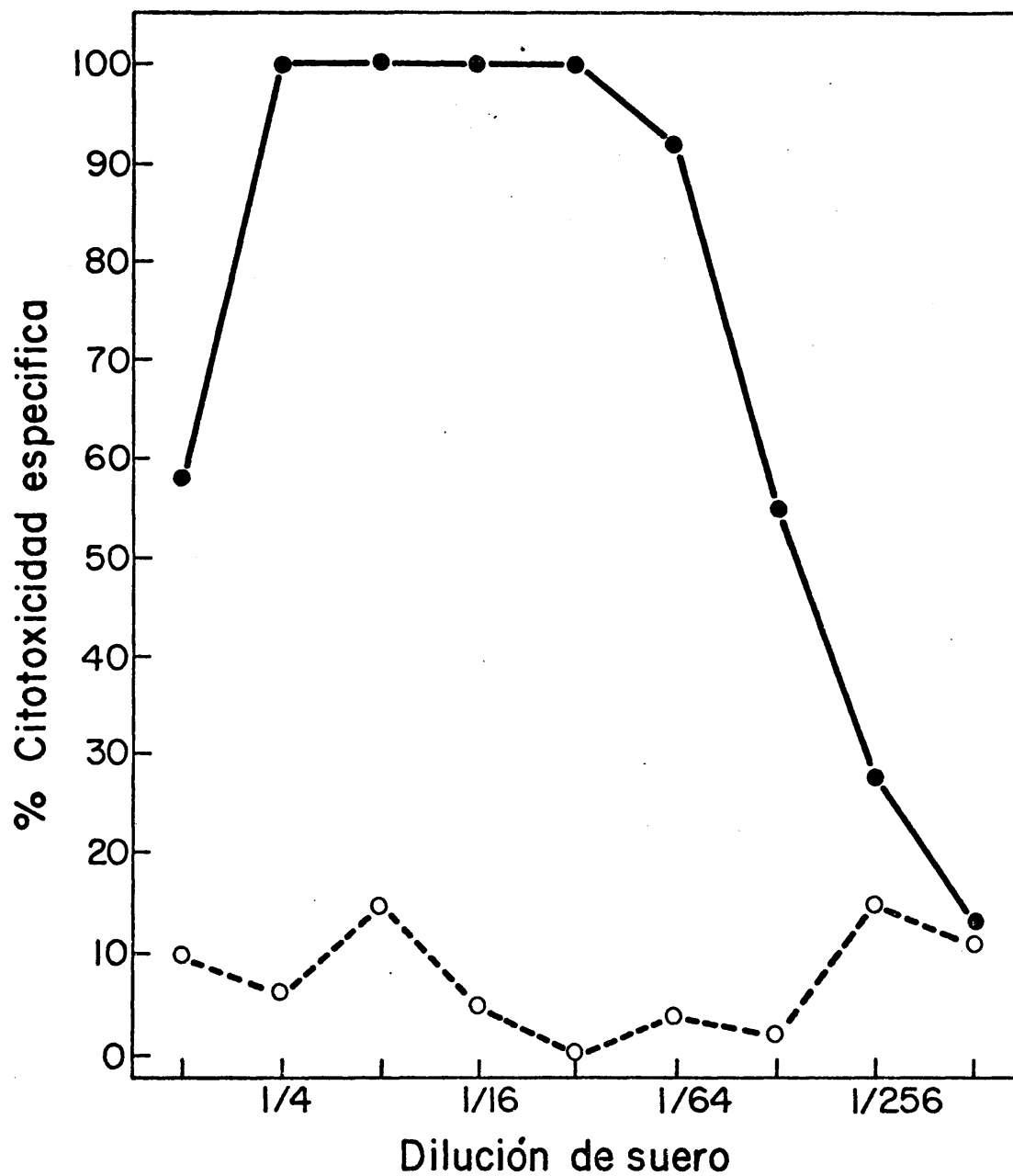


Fig. 57.- Influencia de la inactivación del suero problema.

$^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ a los hematíes, el origen de complemento (cobaya o conejo) y su dosis, la concentración de eritrocitos y la inactivación del suero problema.

Las Figs. 55, 56, y 57 y el cuadro XII dan idea de estos ensayos previos mediante los cuales pudimos establecer que las condiciones idóneas eran en el caso de utilizar hematíes de ratón: una concentración de hematíes de 8×10^5 , complemento de conejo a 1/10 y los antisueros inactivados a 56°C durante 10 minutos. En el caso de utilizar hematíes de carnero la concentración óptima de hematíes 1×10^6 , y complemento de cobaya al 1/20. El ensayo está explicado con detalle en el apartado de Material y Métodos.

Para la técnica de hemaglutinación pasiva acudimos al método explicado en material y métodos aplicándola sobre volúmenes de 0,150 ml en placas de material acrílico.

Una vez realizados los ensayos previos y establecidos las condiciones específicas de trabajo determinamos los anticuerpos humorales anti-LPS en ratón, en función del tiempo. En la Fig. 58 aparecen las variaciones en los niveles de anticuerpos humorales cuando se utiliza para su detección el ensayo de hemaglutinación pasiva o el de immunohemolisis de eritrocitos (SRBC) recubiertos con LPS marcados con $^{51}\text{Cr O}_4\text{Na}_2$. Como puede verse, si se compara con los resultados de la Fig. 53, en estos dos ensayos (sobre todo en el último) se consigue una mayor sensibilidad para estudiar la dinámica de la inmunogénesis de LPS. Los sueros del primer pico de la respuesta son sensibles a la reducción de puentes disulfuro por β -Mercaptoetanol (anticuerpos IgM) como se puede observar en la Fig. 59 mientras que los

del segundo pico de la respuesta no resultan alterados por β -Mercaptoetanol (Immunoglobulinas 7 S).

Por otra parte, también quisimos realizar la determinación de anticuerpos celulares frente a LPS y para ello acudimos al ensayo de JERNE para determinar las células formadoras de anticuerpos mediante recuento de placas hemolíticas directas con eritrocitos sensibilizados con LPS. Así comprobamos la aparición de un máximo de células formadoras de anticuerpos (IgM) alrededor del día 6 después de la inyección de antígeno. (Fig. 60).

También en la Fig. 61 aparecen las placas de hemólisis tal como se pueden ver, directamente (Fig. 61 a) o al microscopio óptico (Fig. 61 b).

La inmunización de conejos frente a LPS se realizó según se indica en material y métodos, obteniéndose títulos de 5.120 para el LPS de B. melitensis y 2560 para el de P. aeruginosa. En ambos casos los anticuerpos son sensibles a la reducción con β -Mercaptoetanol disminuyendo el título -después de este tratamiento- hasta valores de 10. Ello nos permite suponer que, en estos casos, los anticuerpos producidos deben pertenecer al tipo de inmunoglobulinas M. Los eritrocitos utilizados para la hemaglutinación pasiva se recubrieron con LPS de B. melitensis y P. aeruginosa según se explica en material y métodos. En el caso de B. melitensis el LPS se trató previamente con NaOH 0.25 N a 56° C durante una hora seguido de neutralización con ClH de acuerdo con el procedimiento de NETER (1956).

CUADRO XII.- Control de la resistencia inespecífica de hematies de ratón marcados con $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ en presencia de diversas fuentes de complemento.

PROCEDENCIA DEL COMPLEMENTO	DILUCION DE COMPLEMENTO			% de citotoxicidad inespecífica
	1/1	1/5	1/10	1/20
Cobaya	81	36	11	10
Cobaya absor- bido *	62	11	10	10
Conejo 1	-	14	19	14
Conejo 2	-	18	26	20
Conejo 3	-	100	50	26

* Absorción con hematies de ratón (v/v)

- no determinado.

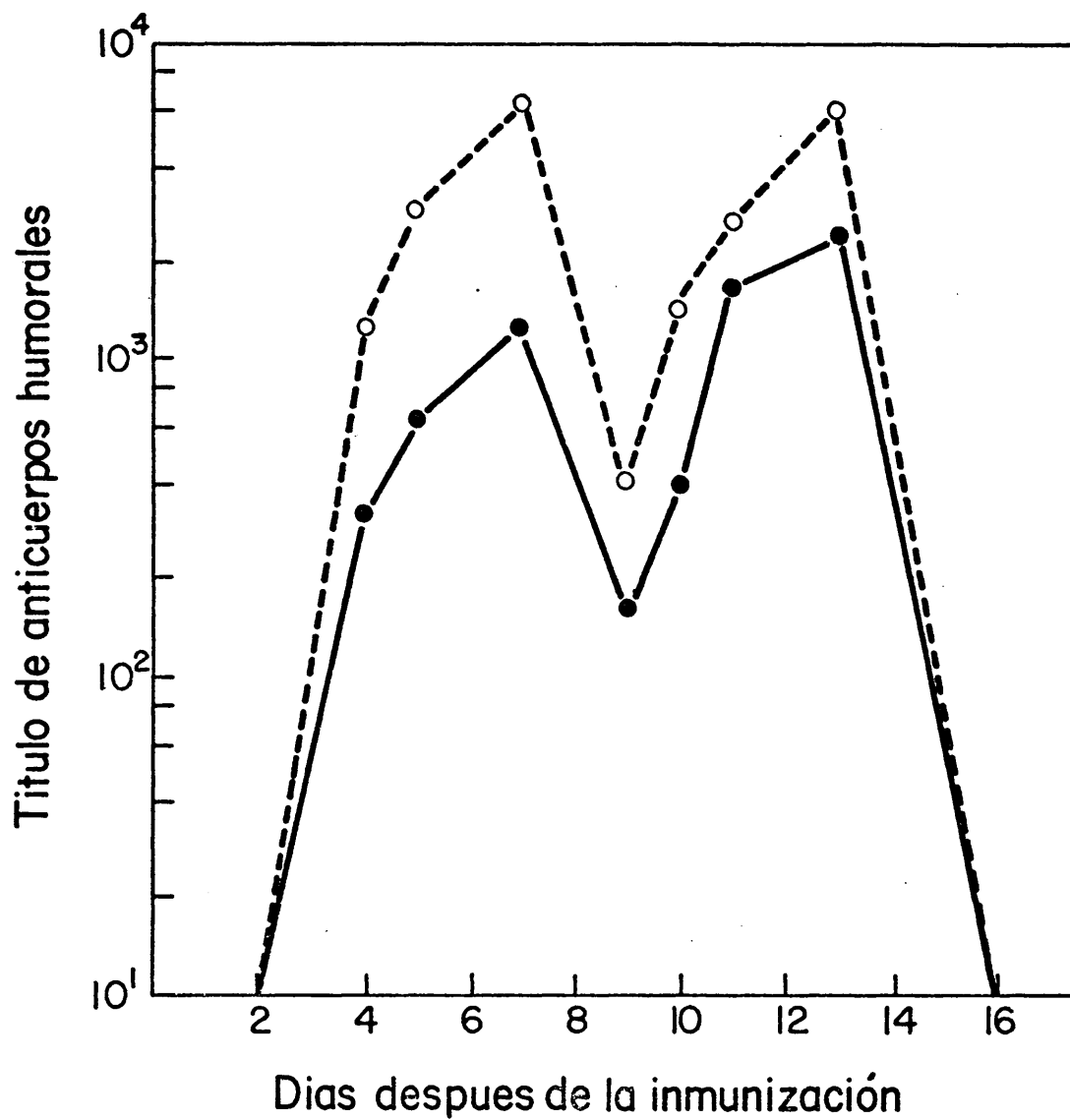


Fig. 58.- Dinamica de la inmunorespuesta humoral frente a lipopolisacarido de *P. aeruginosa* en ratón, detectada por el ensayo de hemaglutinación pasiva e inmunohemólisis.

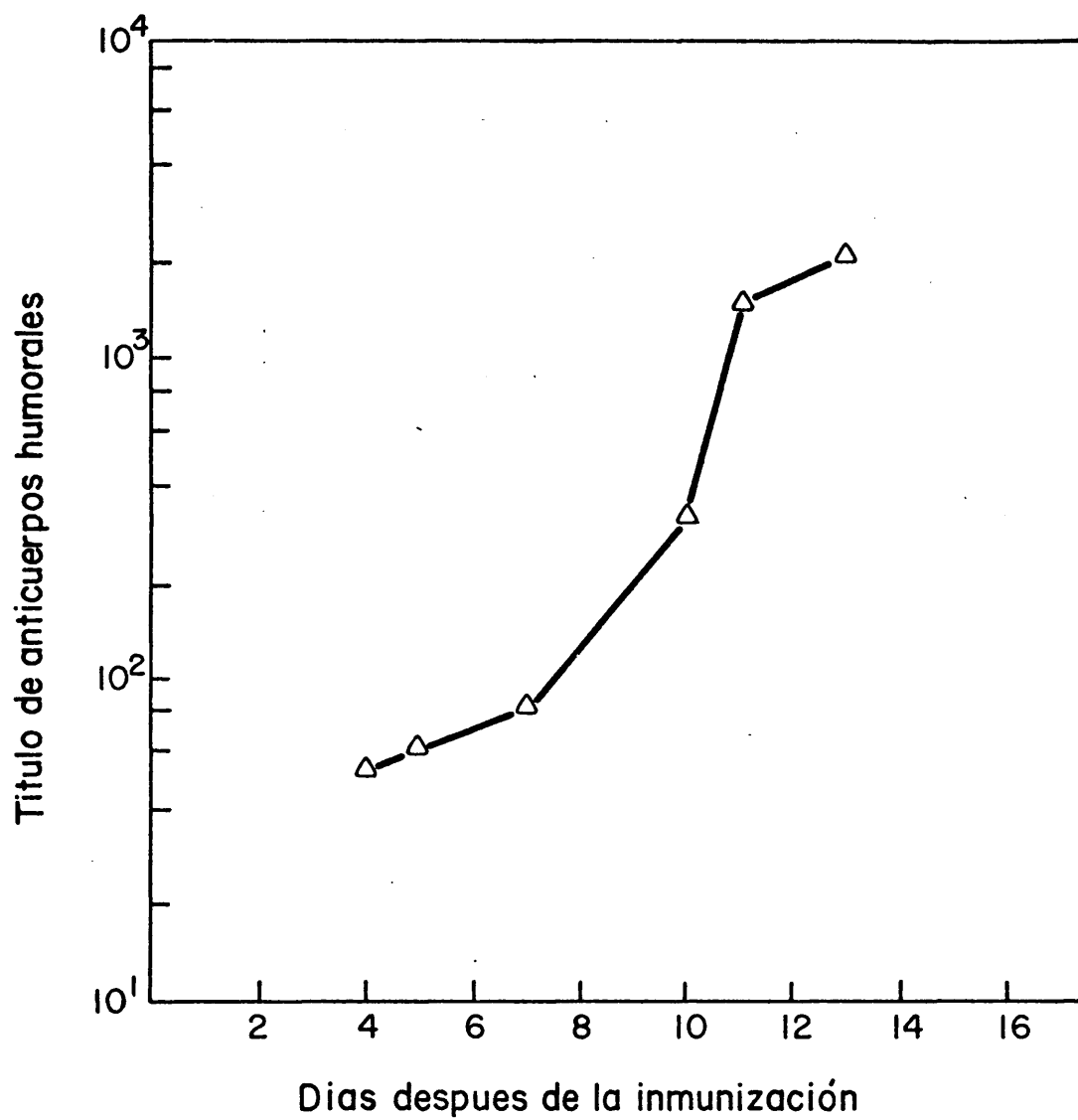


Fig. 59.- Tratamiento con β -mercaptoetanol de los sueros anti-LPS de ratón.

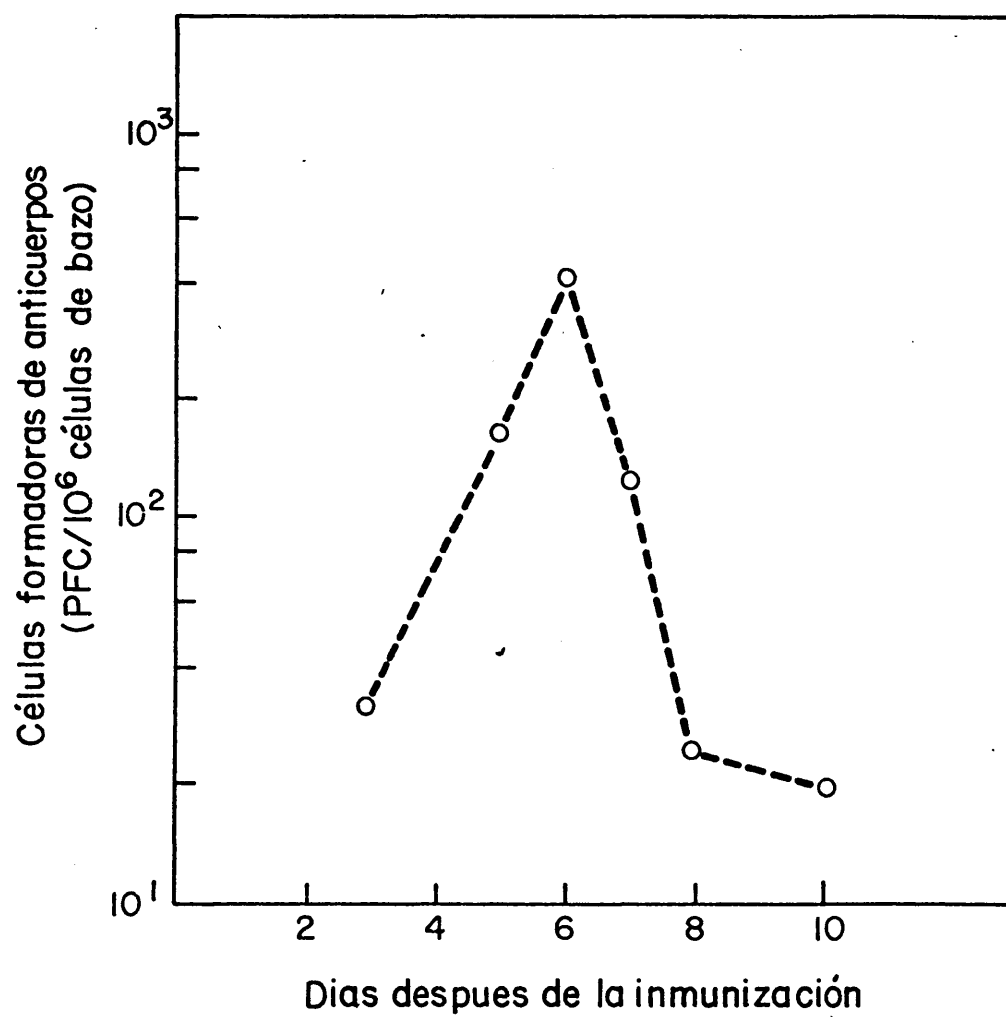


Fig. 60. Inmuno-respuesta celular frente al LPS de P. aeruginosa en ratón.

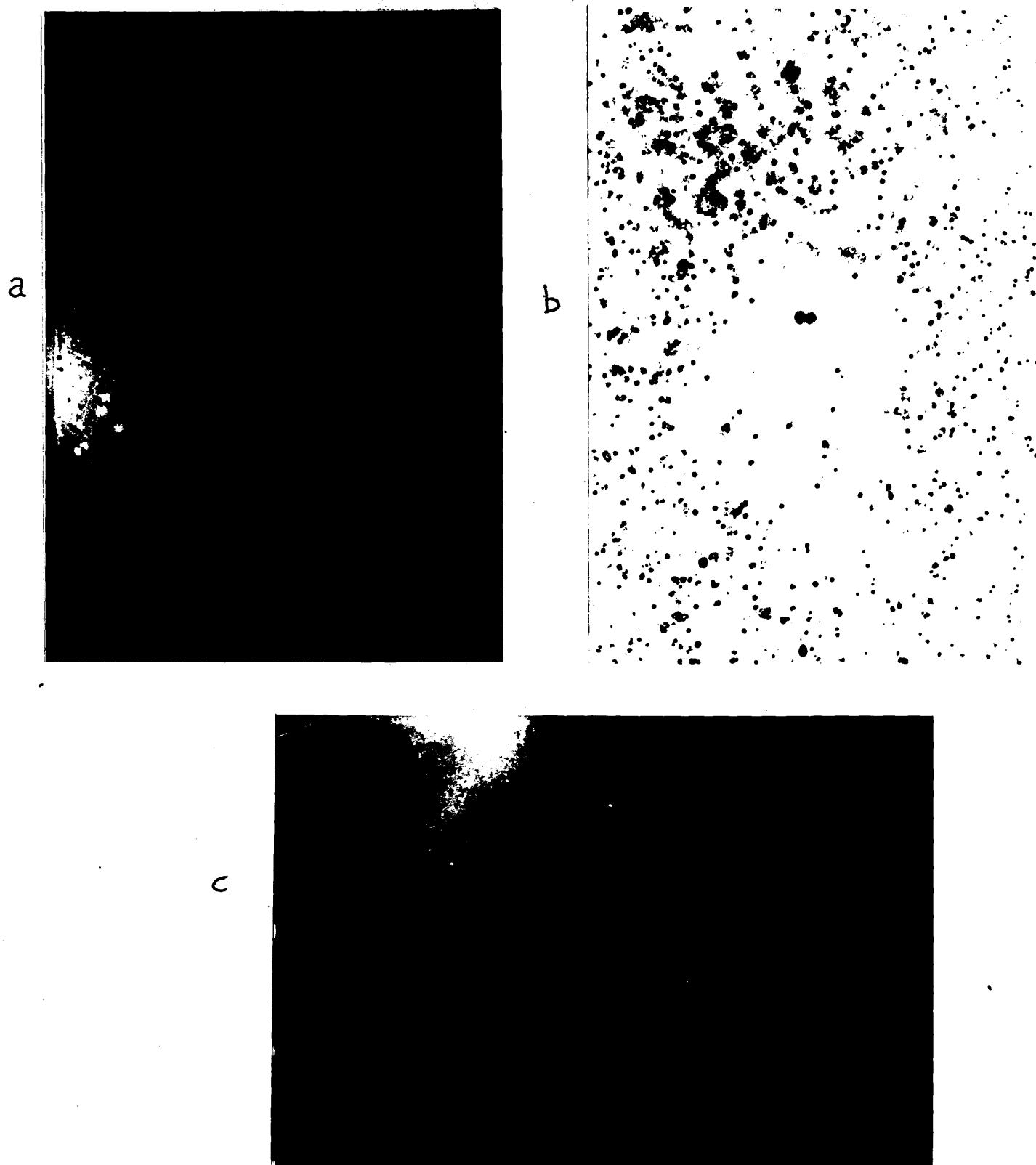


Fig. 61.- Ensayo de placas hemolíticas de JERNE. a) visualizadas directamente, b) observadas al microscopio de contraste de fases, c)) control

7.4. Variaciones de la actividad fagocitaria

En esta ocasión hemos ensayado la influencia de la acción endotóxica sobre la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales de ratón. Para ello hemos establecido dos tipos de experiencias: a) "in vitro", según se indica en el apartado de Material y Métodos; y b) "in vivo" para la que, en esencia, seguimos la misma metodología en el recuento de las bacterias fagocitadas por los macrófagos peritoneales pero realizando la reacción intraperitonealmente en lugar de practicarla en los tubos de cultivo.

Las pruebas "in vitro" dieron los resultados que se indican en la Fig. 62 para 3 horas de observación y añadiendo 100 μ g/ml de endotoxina a los cultivos celulares 30' antes de que se iniciara la reacción.

En cuanto a las variaciones de respuesta fagocitaria "in vivo", el cuadro XIII da una clara idea de los resultados, pudiéndose comprobar el comportamiento de los distintos LPS en relación con la reacción linfocitaria y con el índice fagocitario frente a una infección estafilocócica en ratón. Como se puede ver se utilizaron dos lotes de animales, uno normal y otro que había sido vacunado 10 días después del tratamiento inmunosupresor.

La vacunación se llevó a cabo con una vacuna anti-estafilocócica normalizada, preparada en el laboratorio (suspensión formolada en solución salina de 10^8 bacterias/ml muertas por calor). Las dosis vacunantes fueron de 0,1 a 0,5 ml, inyectadas intravenosamente 2 veces por semana (durante 21 días).

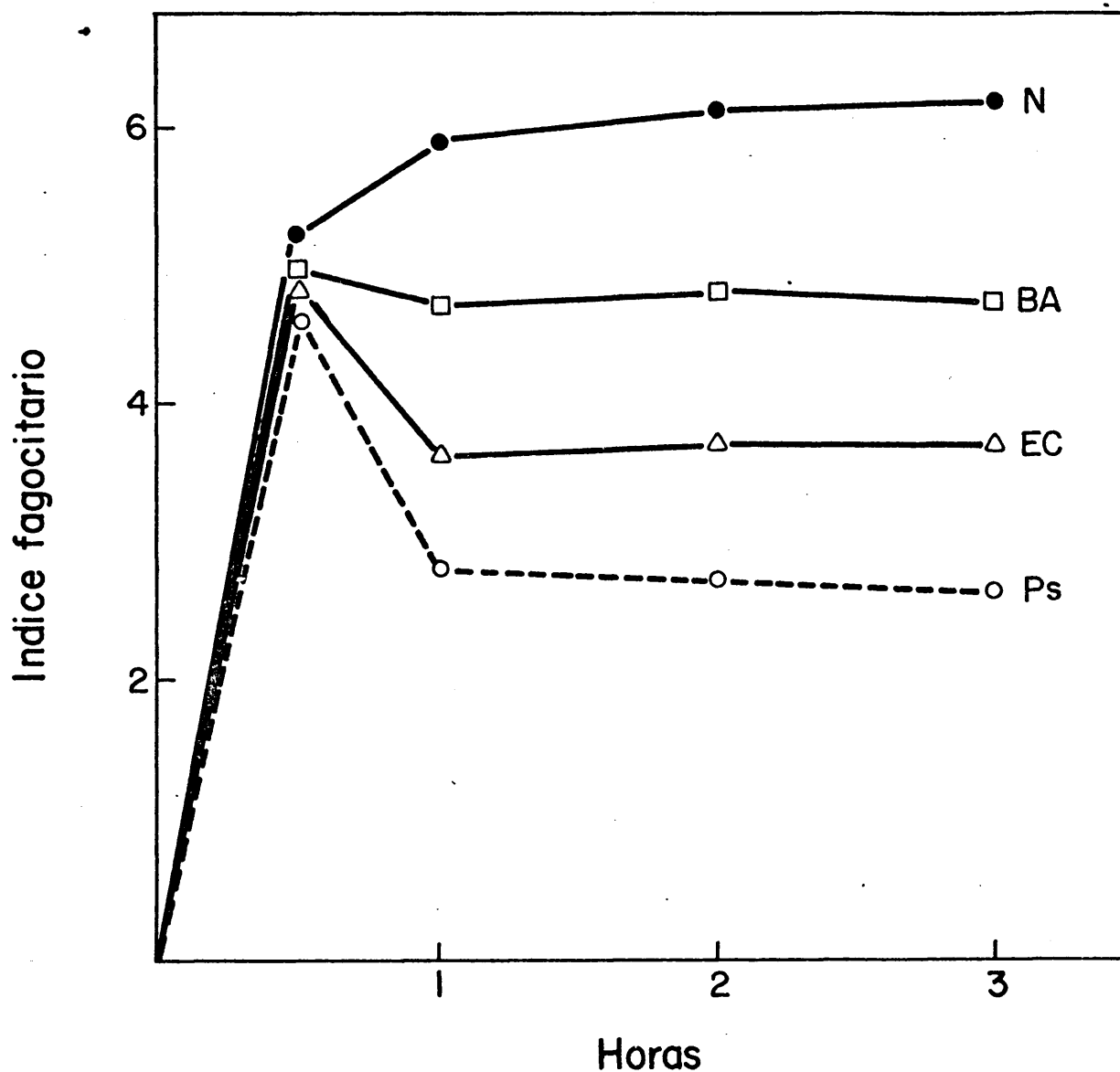


Fig. 62.- Variaciones de la actividad fagocitaria "in vitro" de macrofagos peritoneales de ratón, en presencia de $100\mu\text{g/ml}$ de LPS, obtenidos a partir de P. aeruginosa (PS), E. coli (EC) y B. abortus (BA). Se comparan con los valores normales obtenidos en ausencia de estas moléculas endotóxicas (N).

CUADROXIII- Variaciones de la respuesta fagocitaria "in vivo" de macrófagos peritoneales de ratón contra infecciones estafilocócicas en presencia de distintas endotoxinas.

Endotoxinas ensayadas	Respuesta en animales no vacunados		Respuesta en animales vacunados	
	Células peritoneales x 10 ⁶ /ml	Indice fagocitario	Células peritoneales x 10 ⁶ /ml	Indice fagocitario
Ninguna	1,8	4,7	3,2	6,8
<u>P.aeruginosa</u>	0,22	0,2	0,48	3,1
<u>E. coli</u>	0,56	1,6	1,1	4,9
<u>B. abortus</u>	0,87	2,7	1,3	4,3

Los tratamientos inmunosupresores -a los 10 días antes de la vacunación-, se realizaron inyectando suspensiones (2mg/ml) de endotoxina en solución salina por vía intraperitoneal a la dosis de 0,5 ml y 60 minutos antes de inyectar la suspensión bacteriana de ensayo ($\simeq 3 \times 10^4$ estafilococos en 0.1 ml). Cuarenta y cinco minutos mas tarde se extraian las células peritoneales, se contaban los leucocitos en hematímetro de Thomas y se determinaba el índice fagocitario sobre frotis teñidos por el método de WRIGHT

7.5. Capacidad inmunosupresora

Esta actividad, que como se puede ver en el estudio bibliográfico, es variable cuali y cuantitativamente, se midió utilizando un sistema inmunológico enzima-anti-enzima de gran sensibilidad ya citado en el apartado de métodos. En nuestras condiciones, en primer lugar, controlamos la actividad lítica de una solución de lisozima (10^{-9} M) sobre suspensiones de liofilizados de M. lysodeikticus y después, se midieron las variaciones de inhibición de esta actividad enzimática, producida cuando la lisozima se preincubaba con suero anti-lisozima. Sobre este sistema, se ensayaron distintos sueros de animales que habian estado sometidos a tratamientos inmunitarios específicos anti-lisozima, con o sin endotoxina. Estas actividades, sobre la respuesta inmunitaria, fueron medidas en función de las variaciones de absorción que se producen a 450 nm, al cabo de 12-15 minutos. Los resultados se indican claramente en la Fig. 63.

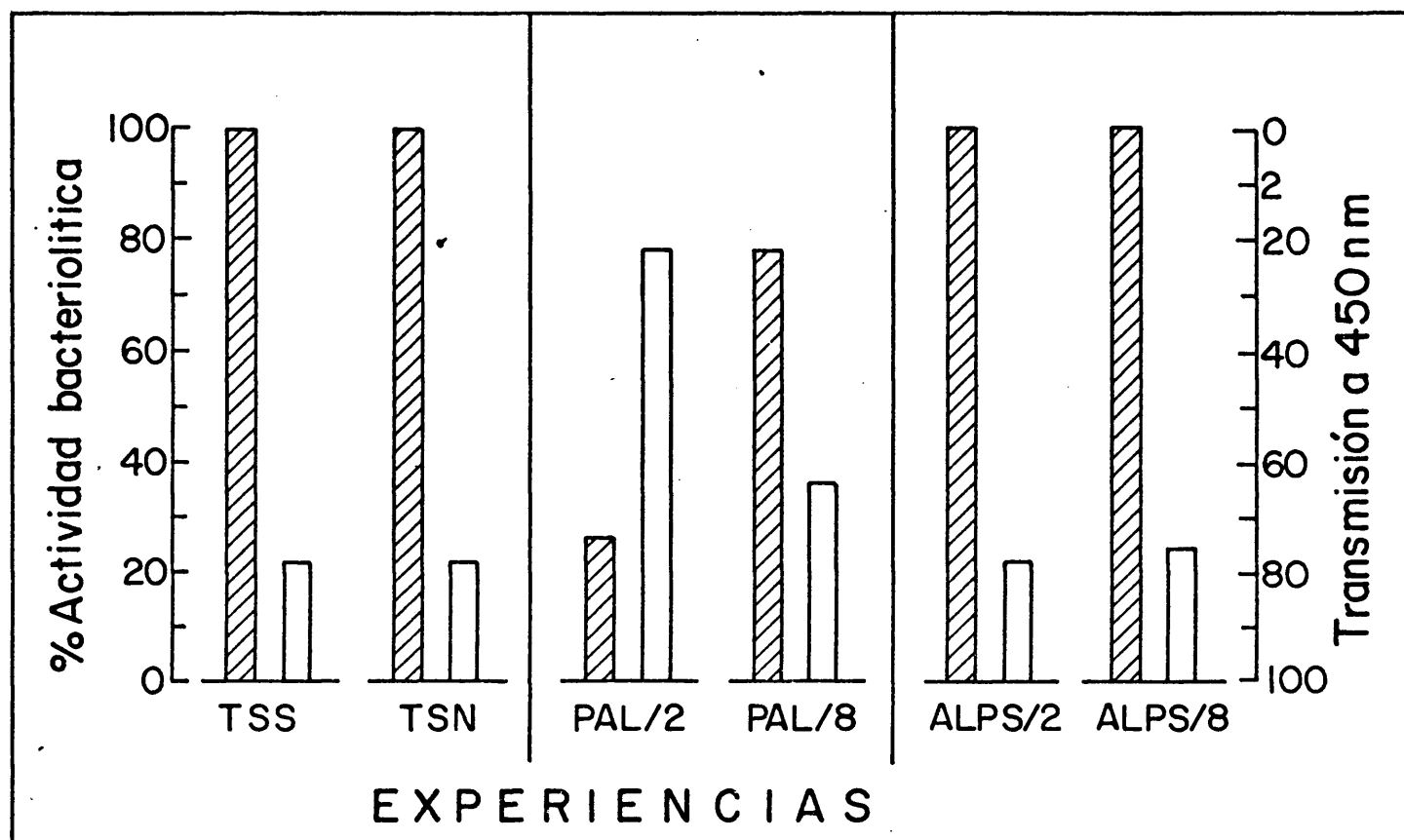


Fig. 63.- Actividad inmunodepresora de los tratamientos endotóxicos sobre un sistema de ensayo lisozima/antilisozima, medida en % de inhibición de la actividad bacteriolítica específica sobre M. lysodeikticus.

Símbolos: TSS - no se utilizó suero; TSN - con suero de conejo normal; PAL - con antisuero anti-lisozima de animales no inmunosuprimidos; ALPS - con antisuero antilisozima de animales inmunosuprimidos con endotoxina.

El ensayo consistió en: 0,25 ml de una solución 10^{-9} M de enzima en tampón fosfato 0.2 M pH 6,2; se mezcla con el mismo volumen de diluciones de suero diferentes y se incuba a temperatura ambiente, durante 30 minutos, antes de medir la actividad de la lisozima. La lisis del sustrato (2,5 ml de solución con 0,3 mg/ml, se controlaba por variaciones de absorción producidas a 450 nm.

Como puede verse, con el suero específico anti-lisozima se producen inhibiciones en la actividad lítica que varían del 74 al 36% según la dilución del antisuero empleado, mientras que este efecto inhibidor no aparece cuando se utiliza suero de animales en los que no se produjeron anticuerpos anti-lisozima por el tratamiento previo con el LPS endotóxico.

Las pautas de los tratamientos están explicadas en el apartado de Material y Métodos.

7.6. Transmisión de la capacidad inmunogénica

Debido a que entre las distintas actividades biológicas de las endotoxinas se citan acciones inmunogénicas, mitogénicas e inmunosupresoras, que pueden tener efectos resultantes totalmente contradictorios hemos considerado de interés medir esta resultante -en endotoxinas de P. aeruginosa- a través de las posibilidades de transmisión de la capacidad inmunogénica.

El sistema biológico de ensayo lo establecimos a base de inmunizar ratones con LPS de Pseudomonas y, una vez conocida la inmuno-respuesta primaria, extraer bazos de animales inmunizados de los que obtuvimos unos extractos de RNA inmunogénico; inyectando, a ratones normales, dosis adecuadas de este material, conseguimos transmitir una información inmunitaria de la que resultaron respuestas -en los animales no inmunizados- que eran semejantes a las obtenidas en los animales previamente tratados con LPS de P. aeruginosa.

Los resultados obtenidos en este sistema biológico de ensayo se irán exponiendo a continuación de acuerdo con las distintas fases establecidas en su realización.

7.6.1. Obtención de crudos de RNA

Para la obtención de este material se recurrió a extirpar bazos en ratones normales (control) y en otros lotes de animales que habían sido inmunizados previamente con LPS. Después de sucesivos ensayos previos se utilizaron animales sometidos a una inmunización primaria con 30 μ g de LPS. Los bazos se extirparon a diferentes intervalos de tiempo después de la inmunización y precisamente en los días tercero, sexto y noveno de la inmunorespuesta primaria.

A partir de este material, se aisló y purificó el RNA por el método previamente indicado en el capítulo de Técnicas y en la Fig. 64 aparece el espectro ultravioleta característico de estas preparaciones de RNA inmunogénico, que presentan un máximo a 254 nm.

Por otra parte, en la Fig. 65, se representan los perfiles obtenidos por centrifugación en gradiente de sacarosa de estas preparaciones de RNA de bazo.

7.6.2. Síntesis de anticuerpos "in vivo" inducida por extractos de RNA procedentes de animales inmunizados frente a LPS.

Como hemos indicado anteriormente, para estos ensayos

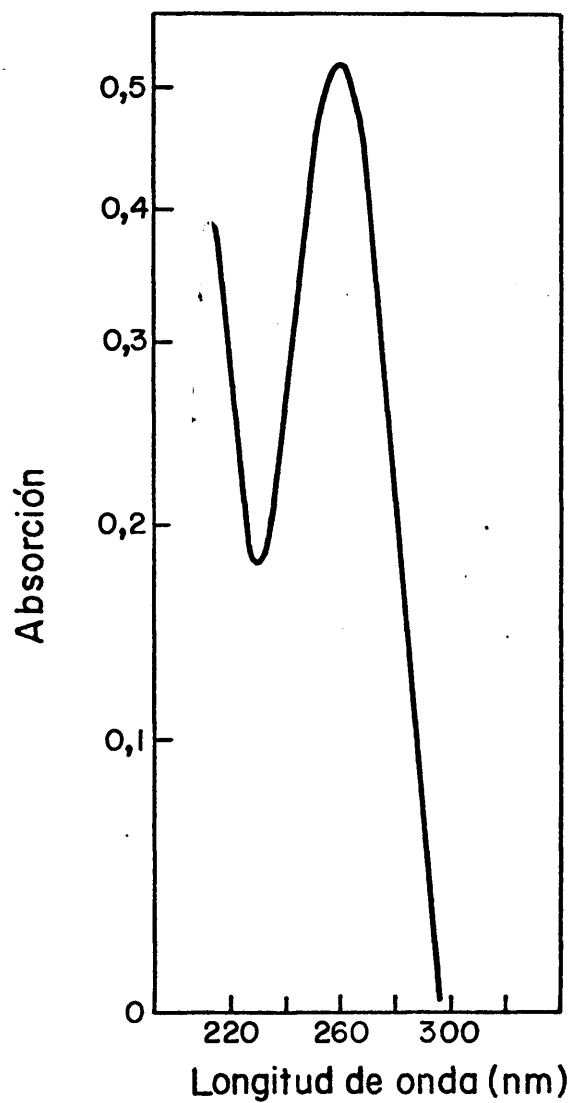


Fig. 64.- Espectro ultravioleta característico de una preparación de RNA inmunogénico.

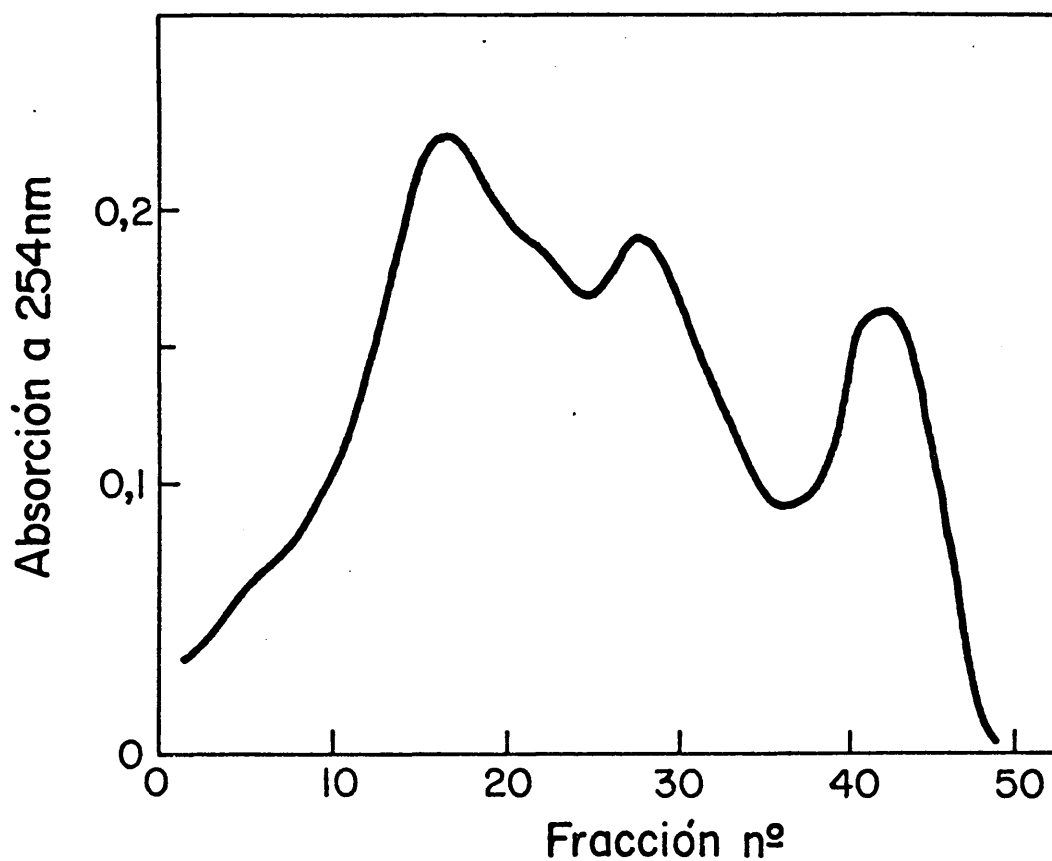


Fig. 65.- Perfil, en un gradiente de sacarosa del 20% al 5%, de una preparación de RNA inmunogénico determinado a 254 nm. El fondo del tubo se encuentra a la derecha de la gráfica.

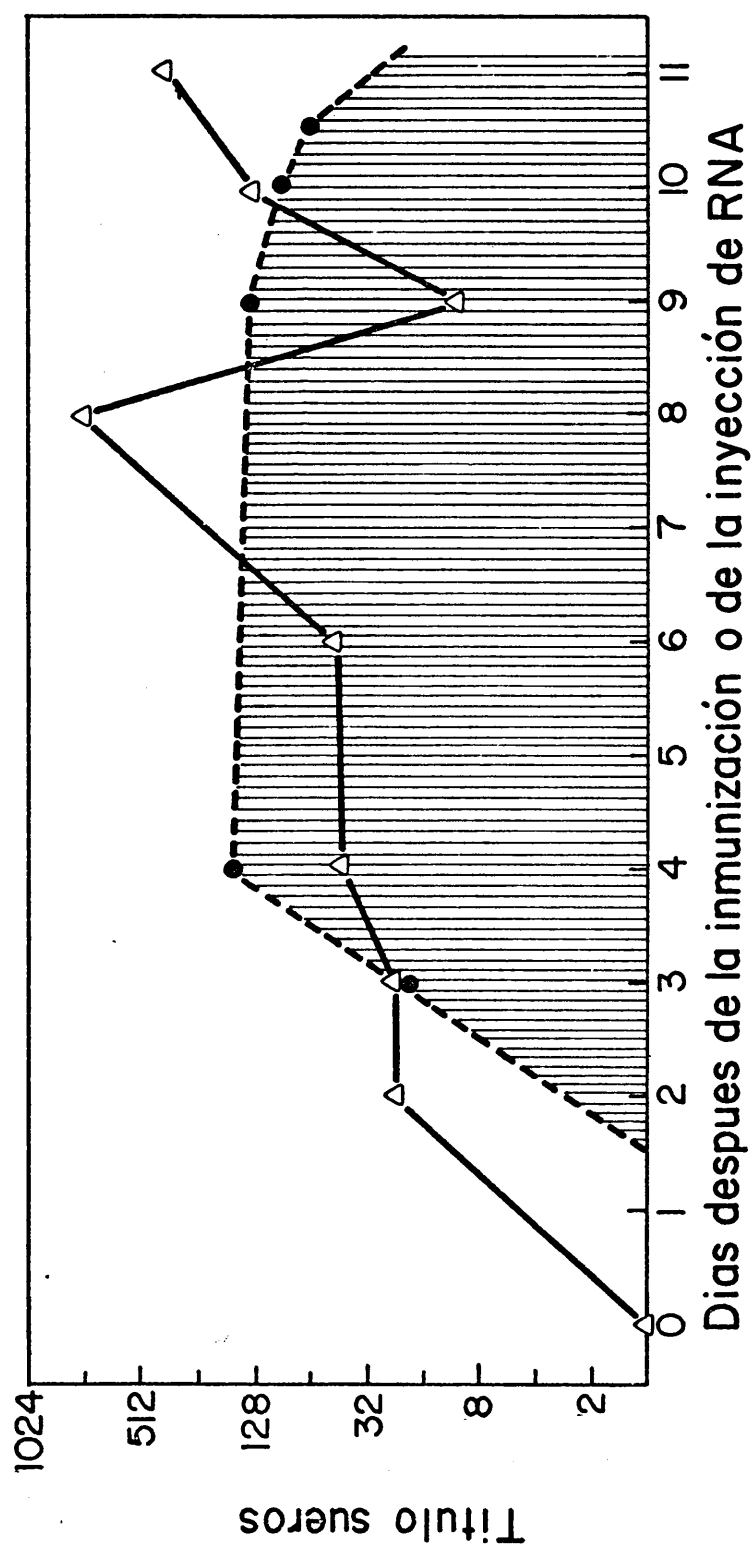


Fig. 66.- Dinámica de la transmisión de información inmunitaria mediante RNA inmunogénico de células inmuno-competentes de bazo, procedentes de animales previamente inmunizadas con endotoxina de *P. aeruginosa*. Se utilizaron bazo del noveno día, extirpados de animales sometidos a una inmunización primera con $30 \mu\text{g}$ de LPS/ratón.

se utilizaron los RNA obtenidos en los días tercero, sexto y noveno después de la inmunización, inyectando intraperitonealmente dosis de 75, 100 y 200 μ g por ratón.

En la Fig. 66 se pueden ver las respuestas obtenidas con 75 μ g de RNA/ratón del noveno día (inmunidad transmitida), comparandola con la respuesta frente a 30 μ g de antígeno (inmuno-respuesta normal).

Así podemos ver que la cinética de la respuesta es similar a la obtenida con el antígeno unicamente, aunque la magnitud de esta respuesta sea algo mas débil.

Como es lógico en este tipo de protocolos experimentales, también establecimos series de control mediante inyección de RNA procedente de animales no inmunizados y de animales inyectados con 50 μ g de LPS (no daban respuesta humoral detectable) y controlamos la especificidad de la respuesta inmunológica, observando que no aparecían anticuerpos frente a otras moléculas endotóxicas ni a polisacáridos de otras bacterias Gram-negativas (Brucella y E. coli). Según pudimos comprobar las preparaciones de RNA obtenidas por nosotros no contenían cantidades de antígeno que fueran detectables por inmunoprecipitación.

7.7. Producción de interferón inespecífico en presencia de LPS.

Dado que la producción de interferón puede constituir un útil sistema biológico para ensayo de endotoxinas en interacciones virus-huesped, hemos establecido una serie de expe-

riencias en las que se mide la capacidad de los LPS como inductores inespecíficos de interferón y se compara con el interferón obtenido en una infección viral, tanto en sus niveles de producción como en sus posibilidades de inhibición por distintos antibióticos.

En la Fig. 67 se observan los rendimientos de interferón obtenidos con el virus de Newcastle (NDV), y los LPS de P. aeruginosa y B. melitensis como inductores. Se ha comprobado que los niveles máximos de interferón se producen con el virus NDV y estos son superiores cuando el virus se inyecta por vía intravenosa en lugar de por vía intramuscular. En esta misma experiencia encontramos que los valores mas bajos se conseguían con los LPS de B. melitensis.

En todos los casos, los máximos aparecen en intervalos comprendidos entre las 4 y 6 horas después de la inoculación de cada inductor.

Por otra parte, también hemos estudiado los efectos que, antibioticos tales como Rifamicina, Rifampicina y Cromomicina A₃, podían tener sobre la producción de estos tipos de interferones. Así hemos observado que la máxima inhibición de esta inducción se produce cuando se administran estos antibióticos de 4 a 2 horas antes de que se inyecte el inductor. La rifamicina S.V. es la molécula que produjo la acción mas inhibidora, incluso cuando se administró 4 horas después que los inductores de interferón. Cuando comparamos, según nuestros resultados, la producción de los distintos interferones en presencia de rifamicina la inducción de interferón por el NDV se deprime más que los interferones inducidos por endotoxinas y

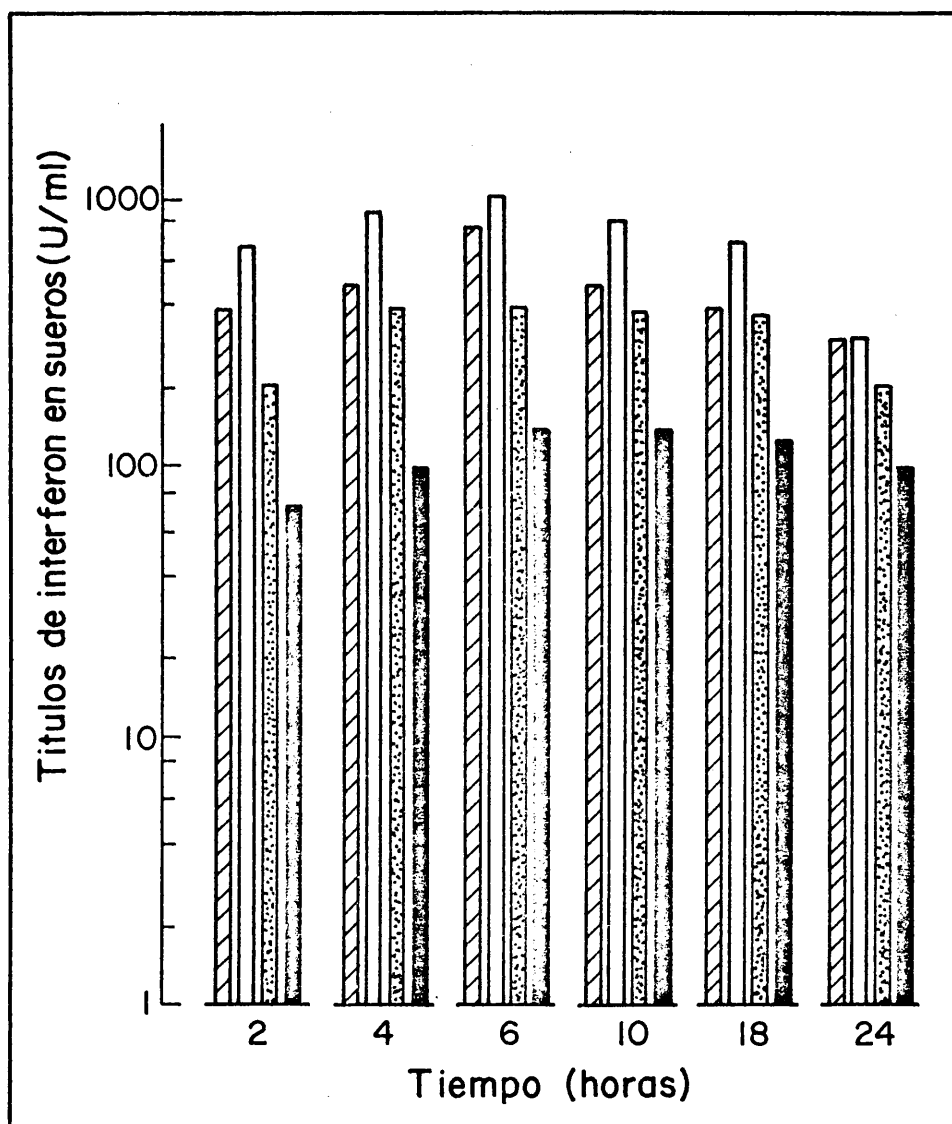


Fig. 67.- Variaciones en la producción de interferon -inducidos por NDV, LPS de *P. aeruginosa*, o de *B. melitensis*- determinadas en muestras de suero de pollo recogidas a distintos tiempos. ▨ NDV i.m.; □ NDV, i.v.; ▤ LPS *P.aeruginosa*; ▩ LPS *B.melitensis*.

de estos últimos el interferón inducido por B. melitensis es el que resultó mas sensible a la inhibición.

7.8. Efecto de LPS bacterianos sobre el crecimiento del mastocitoma P815 y "in vitro".

En los ensayos de este tipo de actividad endotóxica, encontramos los resultados que aparecen en la Fig. 68. Como puede comprobarse, los LPS estudiados no produjeron ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de este tipo de tumor "in vitro". Ello no quiere decir que quizá no hubieramos encontrado algunos efectos positivos si hubieramos realizado pruebas "in vivo", pero la dificultad de conseguir esta raza de ratones en número suficiente nos obligó a no continuar la experiencia.

7.9. Efecto de la indometacina sobre la respuesta inmune frente a lipopolisacárido de P. aeruginosa.

Finalmente, como otra posibilidad a estudiar en estas investigaciones inmunobiológicas sobre endotoxinas, hemos querido comprobar las variaciones de respuesta antigénica frente a LPS cuando intervienen antiinflamatorios no esteroides con actividad inmunosupresora. Para ello hemos recurrido a estudiar la dinámica de una inmuno-respuesta primaria anti-LPS de Pseudomonas en animales sometidos a tratamiento indometacínico.

Así pudimos comprobar que el tratamiento con indometacina (4 mg/Kg/día), tres días antes y simultaneamente con la inyección de LPS, produce una disminución en el título de anticuerpos humorales. En el cuadro XIV aparecen los resultados obtenidos.

En la Fig. 69 se muestra el efecto de este antiinflamatorio sobre la respuesta primaria frente a SRBC con ratón

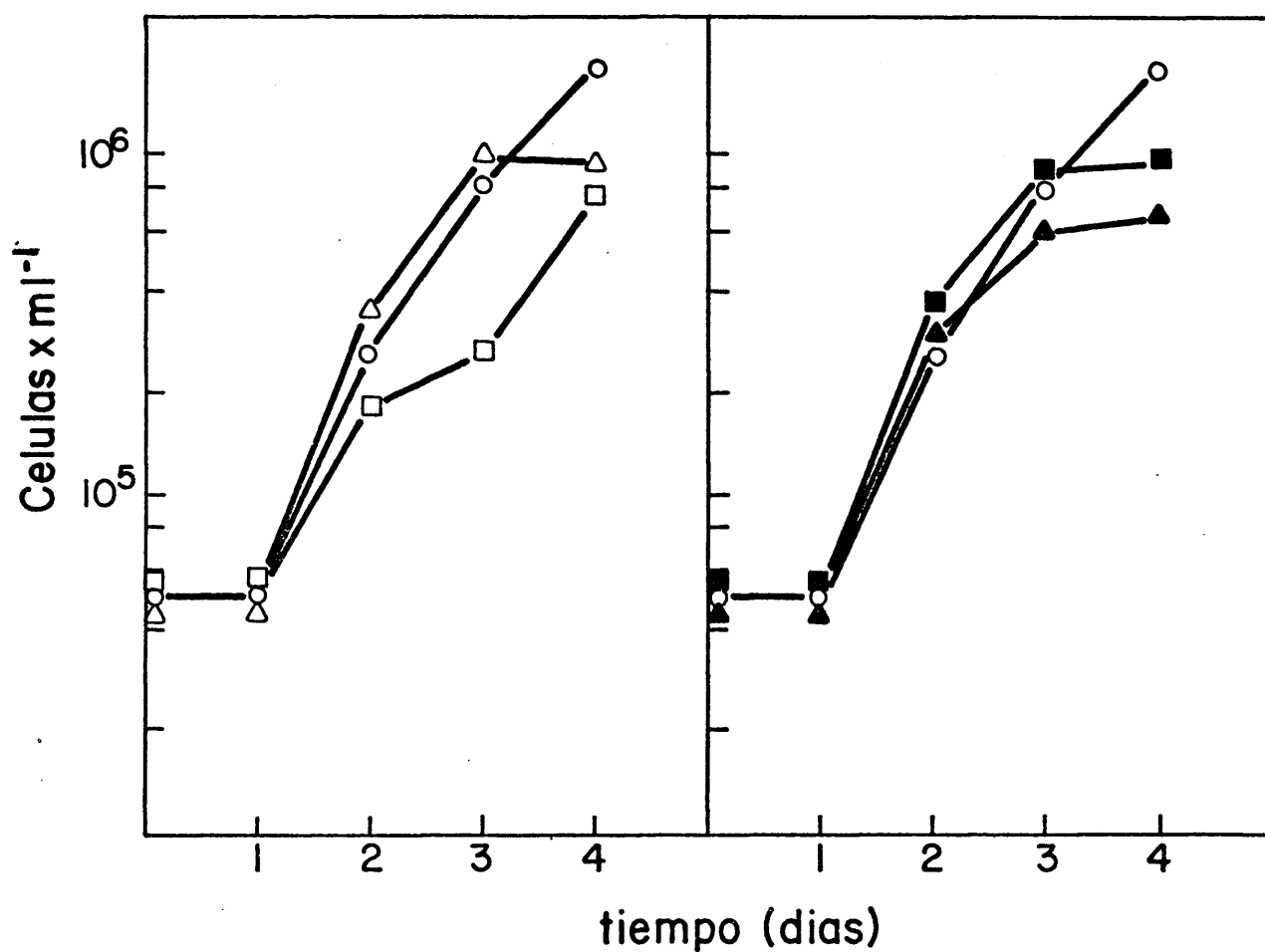


Fig. 68 - Efecto de los LPS de *B. melitensis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. typhi* sobre el crecimiento del mastocitoma P815. o-o, cultivo normal, Δ-Δ, *P. aeruginosa*, □-□, *S. typhi*, ■-■, *B. melitensis*, ▲-▲, *E. coli*.

CUADRO XIV.- Efecto de la indometacina en la respuesta primaria a LPS de P. aeruginosa en ratón.

Tratamiento Immunodepresor	Título de anticuerpos después de la inyección de antígeno.				Anticuerpos humora- les determinados por.
	2	5	7	10 días	
Ninguno	-	2320	6650	5880	Inmunohemolisis
Indometacina	-	1280	2500	3200	
Ninguno	-	320	640	640	Hemaglutinación
Indometacina	10	160	320	640	
Ninguno	0	1	8	4	Inmunoprecipitación de Ouchterlony.
Indometacina	0	0	2	2	

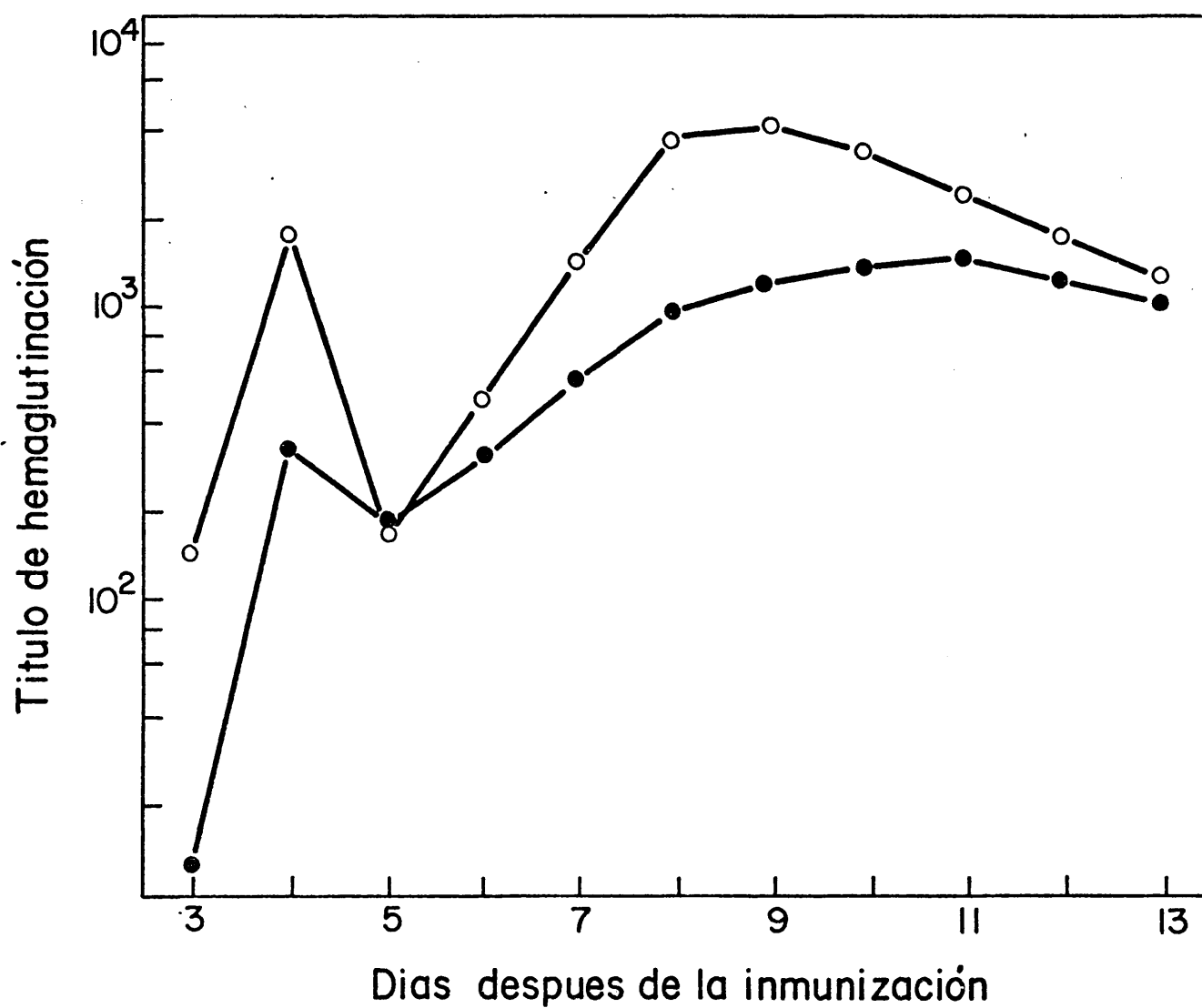


Fig. 69 - Efecto de la Indometacina sobre la respuesta inmune primaria en ratón frente a eritrocitos de carnero.
o-o, respuesta de animales no tratados.
●-●, respuesta de animales tratados

IV. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

En este capítulo -a la vista de los antecedentes que previamente se citan- se comentan y discuten los resultados obtenidos agrupándolos en apartados que se refieren a las distintas partes de este estudio inmunobiológico:

1) En relación con la obtención y purificación de endotoxinas.

Dado la complejidad de las moléculas endotóxicas es lógico admitir que los estudios sobre interacción huesped-parásito, con intervención de LPS, presenten gran número de dificultades y especialmente en aquellos trabajos en que se utilizan endotoxinas marcadas. De aquí, el interés de recomendar una normativa o métodos de fácil control que permitan conseguir preparaciones de referencia normalizada.

De los procedimientos utilizados para la obtención del lipopolisacárido de P. aeruginosa, la extracción por fenol-agua (con rendimiento del 6,7% en peso seco de bacterias) ó por EDTA, a partir de paredes celulares (rendimiento de un 1,7 %), el primero de ellos (WESTPHAL y JANN, 1965) es el que produjo mejores resultados; resultó ser el más sencillo, rápido y de mejor rendimiento. Es el método más comúnmente utilizado para la extracción de lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas de variedad lisas. Un inconveniente de este método es la gran contaminación con ácidos nucleicos que aparece en estas preparaciones crudas (aproximadamente el 50-60%).

Sin embargo, el método de extracción con EDTA, aunque nos dió rendimientos mas bajos, presentó una menor contaminación. Los rendimientos que obtuvimos con el procedimiento de fenol-agua son similares a los conseguidos por diversos autores con otros lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas (WESTPHAL y JANN, 1.965; ADAMS, 1.972). Con los lipopolisacáridos de S. typhi y E. coli, los rendimientos de LPS crudo (7,2% y 8% respectivamente) fueron ligeramente más elevados que los conseguidos para P. aeruginosa, presentando también una contaminación muy alta de ácidos nucleicos. En las extracciones de lipopolisacáridos de B. melitensis, B. abortus y Y. enterocolitica empleamos también el método de WESTPHAL y JANN (1965), pero utilizamos la fase fenólica en lugar de la acuosa, debido a que obtuvimos (en esta fracción) unos rendimientos mayores de lipopolisacáridos biológicamente activos para estas bacterias; lo mismo que otros autores para los LPS de Citrobacter freundii (RAFF y WHEAT, 1968), Xanthomonas campestris (HICKMAN y ASHWELL, 1966), B. abortus, B. melitensis, y B. suis (LEONG y cols 1970), Rhodopseudomonas palustris (WECKESSER y cols, 1973), Vibrio marinus (DENEKE y COLWELL, 1973) y Anabaena variabilis (WECKESSER y cols, 1974). HURVELL (1973)

encuentra que los rendimientos en peso seco de los lipopolisacáridos de B. abortus, en la fase fenólica, son 3 veces mayores que los obtenidos en la fase acuosa; sin embargo, en el caso de Y. enterocolitica tipo IX, el rendimiento es mayor en la fase acuosa, aunque la preparación inmunobiológicamente activa es la correspondiente a la fase fenólica. Los rendimientos de lipopolisacárido expresados en % del peso seco de bacterias son 2,63, 2,8 y 0,5 para los lipopolisacáridos de B. melitensis, B. abortus y Y. enterocolitica, respectivamente.

En cuanto a la purificación del LPS, procedente de P. aeruginosa, se han utilizado tres métodos: sedimentación en ultracentrífuga, ultrafiltración y cromatografía en Sepharosa 4B y 2B. En los tres casos, el lipopolisacárido crudo fué tratado previamente con nucleasas. Los rendimientos de LPS purificado, obtenidos por ultrafiltración y cromatografía en gel, son muy similares (2,9% y 2,5% respectivamente); sin embargo, por sedimentación, obtuvimos la tercera parte de peso seco del LPS obtenido por otros métodos (1%); siendo, en este caso, el rendimiento de un valor aproximado al que obtuvimos para el lipopolisacárido de E. coli O111: B4, aunque nuestros rendimientos son algo menores. También FENSOM y GRAY (1969) obtienen para el LPS de P. aeruginosa N.C.T.C. 1999, purificado por sedimentación, un rendimiento de 1% del peso seco de bacterias; similar al que obtenemos nosotros, pero menor que el que obtienen WESTPHAL y JANN (1965) de otras enterobacteraceas (1,5 - 2,5%). SAMUELSSON y cols (1974) obtienen rendimientos de 0.5 - 1% con el lipopolisacárido de Y. pseudotuberculosis extraído de la fase acuosa y purificado por sedimentación, mientras que HARTLEY

y cols (1979) obtienen, para el LPS de Y. pestis, un 1,9% de rendimiento al purificarlo por sedimentación, precedida por tratamiento enzimático.

Con los lipopolisacáridos de E. coli obtuvimos un rendimiento de material purificado equivalente al 2,1, 4,3 y 4% y para el de S. typhi de 1,8, 3,2 y 2,7%, según que utilizáramos para purificar la muestra, la técnica de sedimentación, ultrafiltración ó cromatografía en gel.

Para los lipopolisacáridos de B. melitensis, B. abortus y Y. enterocolitica, purificados por precipitación selectiva con acetato sódico -metanol seguida de cromatografía en gel de Sepharosa 4B obtuvimos rendimientos similares a los conseguidos por LEONG y COLS 1970 y por HURVELL(1973), con estos mismos lipopolisacáridos, en otras cepas bacterianas.

De todos los métodos empleados por nosotros, para purificar los lipopolisacáridos objeto de este estudio, el que ha conseguido un mayor grado de pureza en las muestras obtenidas, ha sido la combinación de ultrafiltración con cromatografía en gel de Sepharosa 2B, ya que los lipopolisacáridos purificados por sedimentación presentaron un segundo pico, observable por cromatografía en gel.

Como es sabido, las endotoxinas bacterianas son biológicamente activas a concentraciones muy bajas y en ocasiones, para conseguir una exacta determinación cuantitativa -en investigaciones moleculares- resulta obligado recurrir al empleo de moléculas marcadas con radioisotopos.

De los distintos métodos descritos para el marcado de moléculas endotóxicas, el del ^{32}P - fosfato - preconizado por ROWLEY y cols (1956)- no lo hemos ensayado por requerir grandes cantidades de isótopo y obligarnos a estar manejando, durante todo el proceso de estracción y purificación, materiales muy radioactivos de los que, por otra parte, tan solo se incorpora a la endotoxina una mínima proporción. El empleo de ^{131}I , recomendado por SELIGMAN y cols (1948) y por BARNES y cols (1952), tan solo puede ser utilizado con éxito en endotoxinas parcialmente purificadas; según NOWOTNY (1971) este marcado se efectúa por la existencia de tirosina, en las totalmente crudas, y por los contaminantes proteicos o polipeptídicos en las que están algo más purificadas. Así, KECK (1973) marca el lipopolisacárido de S. anatum con ^{125}I -yoduro potásico, para lo cual prepara primero un tiramil derivado del LPS, introduciendo seguidamente el ^{125}I ; este autor sugiere la posibilidad de utilizar ^3H -borohidruro en uno de los primeros pasos del proceso para marcarlos con ^3H , pero en nuestra opinión no se consiguen tan buenos resultados y el método resulta mas complicado.

Recientemente, TOMASULO y cols (1975) han marcado una preparación comercial de endotoxina de E. coli B026: B6 - obtenida por el método de BOIVIN- utilizando tres métodos diferentes : reducción con ^3H -borohidruro sódico de la endotoxina nativa, reducción con ^3H - borohidruro sódico de endotoxinas previamente oxidadas con metaperyodato sódico y, por último, exposición de endotoxina liofilizada a gas de tritio (WILZBACH, 1957). El rendimiento químico

máximo de marcado, lo obtienen en el primer caso; sin embargo, la actividad biológica de esta preparación es menor que con los otros dos procedimientos.

Nuestros resultados en el marcado del lipopolisacárido de P. aeruginosa, "in vivo" con ^3H -glucosamina, no fueron satisfactorios ya que el rendimiento que obtuvimos fué tres veces más pequeño que el que obtuvieron BARA y cols (1973) con el glicolípido de S. minnesota, extraído por el procedimiento de GALANOS y cols (1969). La endotoxina de P. aeruginosa, que obtuvimos marcada por este método, presentó idénticos comportamiento cromatográfico, características espectroscópicas y reacción colorimétrica que la preparación fría y su actividad biológica, medida con el ensayo del lisado de amebocitos de Limulus, también fué muy semejante. Sin embargo, debido a su baja actividad específica, no se puede considerar útil para trabajos de localización de lipopolisacáridos en animales con endotoxemias, ya que estos son activos a muy bajas concentraciones y no se podrían detectar. Comparando nuestros resultados con aquellos obtenidos por TOMASULO y cols (1975) -mediante marcado "in vitro"- comprobamos que ellos consiguen una actividad específica de 0.18 m Ci/gr de endotoxina, mientras que nosotros con un marcado "in vivo" solo conseguimos 0,022 m Ci/gr. La diferencia quizá sea debida a que la preparación de estos autores no tiene el grado de pureza que las nuestras, ya que como único procedimiento de purificación utilizan Sepharosa 6B de límite de exclusión bastante bajo. Esto puede condicionar el que consigan un rendimiento bastante alto, quizá por la posible contaminación con material proteico no separado del LPS. Como puede verse, en nuestras experiencias de marca

do de endotoxinas de B. melitensis y P. aeruginosa con ^{51}Cr -cromato disódico obtuvimos mejores resultados, ya que alcanzamos actividades específicas de 1,8 m Ci/g de LPS. En este método, la estructura química de la unión entre el metal hexavalente y la endotoxina no está bien definida todavía; aunque se ha sugerido, sin embargo, que el metal puede unirse a los constituyentes lipídicos no saturados del LPS (BRAUDE y cols 1955). Los dos lipopolisacáridos que marcamos con $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$, mostraron una estabilidad bastante buena, según pudimos determinar por cromatografía en Sephadex G 50, dialisis y cromatografía en papel y no observamos pérdida de actividad biológica detectable (DL_{50} ó pirogenicidad). Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos anteriormente por LEONG y cols (1968) con el lipopolisacárido de B. abortus, ya que los rendimientos de marcado son muy similares y tampoco se observa pérdida en la actividad biológica (DL_{50}).

Ello no obstante, existen dos inconvenientes para este método: la vida media del isótopo $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ es de 27,8 días por lo que el almacenamiento de la endotoxina no puede ser largo y, por otra parte, al no existir datos concluyentes sobre la naturaleza de los enlaces del cromato y la endotoxina hace que estas preparaciones se utilicen en los estudios biológicos "in vivo" con ciertas reservas.

- 2) En cuanto a las características analíticas, físico-químicas y estructurales, como criterios de pureza.

Según puede verse, las endotoxinas por nosotros estudiadas presentan un espectro ultravioleta característico para estas moléculas, careciendo de hombros en la zona de 260 nm, lo que parece indicar que no poseen ácidos nucleicos contaminantes. (RIBI y cols 1966, TSANG y cols, 1970).

En cuanto a los estudios analíticos realizados, mediante espectroscopía infrarroja, de los distintos LPS estudiados presentan bastantes dificultades de interpretación, ya que la asignación de bandas de absorción a los distintos grupos funcionales ha de ser aproximada -en muchas ocasiones- por carecer de moléculas que pueden servir de referencia. De todas formas, sí hemos podido controlar diferencias que parecen derivadas del grado de purificación de las muestras, comprobando la desaparición de las bandas de absorción situadas a 815 cm^{-1} , 960 cm^{-1} , 1065 cm^{-1} y 1230 cm^{-1} que son debidas a ácidos nucleicos.

Según la bibliografía consultada, las bandas que nos parecen más significativas -entre las encontradas en estos lipopolisacáridos- son : las situadas a 3.500 cm^{-1}

3.200 cm^{-1} , debidos seguramente a las vibraciones de los grupos hidroxilo y amino, y la situada a 735 cm^{-1} , vibración de valencia atribuible al grupo carbonilo (C=O) de los esteres de ácidos grasos; las localizadas a 1630 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} , debidas a las vibraciones de valencia producidas por la presencia de iones carboxilato (COO^-), aunque algunos autores también las asignan a un grupo amino y carboxilo respectivamente; las bandas a 1650 cm^{-1} y $1560\text{--}1508\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a bandas amida I y amida II ó a una vibración de valencia del grupo C=O y de deformación del grupo N-H respectivamente. La asignación de estas últimas bandas, sin embargo, parece mas discutible, ya que JENNINGS y cols (1973) y HOLLINGDALE (1975) -estudiando los espectros infrarrojos de los lipopolisacáridos de Neisseria meningitidis y Micropolyspora faeni- las atribuyen a grupos amida monosustituídos ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$) pertenecientes a moléculas tales como N-acil-hexosaminas; mientras que HARTLEY y cols (1974), interpretando los espectros del lipopolisacárido de Y. pestis, concluyen que debido a que las bandas de absorción atribuibles a esteres de ácidos grasos son bastante débiles en comparación con las bandas características de N-acilhexosaminas, pudieran servir como indicadores de que existe una gran parte de ácidos grasos en la molécula con unión amida. Por nuestra parte, en los lipopolisacáridos estudiados por nosotros, hemos visto que ocurre este mismo fenómeno y podríamos atribuirlo a uniones amida de los ácidos

grasos. El hombro a 890 cm^{-1} puede indicar la presencia de uniones β -glicosídicas.

La interpretación que hemos realizado está de acuerdo con los estudios realizados con LPS de Y.pestis, Thiobacillus ferrooxidans, Azotobacter vinelandii, Serratia marcescens, Micropolyspora faeni y Neisseria meningitidis (HART LEY y cols, 1974; HIRT y VESTAL, 1975; OLINS y WARNER, 1967; TSANG y cols, 1974; HOLLINGDALE, 1975; y JENNINGS y cols 1973).

En relación con las técnicas espectro-colorimétricas, JANDA y WORK (1971) han observado que los lipopolisácaridos bacterianos por el lípido A causan un desplazamiento del máximo de absorción de un colorante catiónico (carbocianina) de 510 nm a 472 nm; mientras que otros autores (EDSTROM, 1969) han demostrado que los polisacáridos ácidos y los ácidos nucleicos producen un desplazamiento en el máximo de absorción del colorante a la región de 600-650 nm. Como puede verse, cada uno de estos trabajos presentan en sus resultados tan sólo una parte del espectro visible. En nuestro caso, sin embargo, encontramos que ambas zonas del espectro son importantes con los lipopolisacáridos utilizados en este estudio para estudios cualitativos y cuantitativos. En este sentido, KAY y cols (1964) observaron que los desplazamientos en el máximo de absorción a la región de los 640 nm se debía a una mayor

concentración de colorante fijado a las moléculas de LPS; en tanto que, HIRT y VESTAL (1975), mucho más tarde, estudiando los distintos lipopolisacáridos de Thiobacillus ferrooxidans (según se cultive con hierro (Fe-LPS), azufre (S-LPS) ó glucosa (G-LPS) como fuente de energía) observa que el Fe-LPS que posee forma de cinta al microscopio electrónico sólo presenta un máximo a 472 nm, mientras que el S-LPS que tiene forma vesicular ó globular presenta únicamente el de 640 nm, y presentándose ambos máximos en el G-LPS en el que coexisten ambas formas. Nosotros hemos encontrado que el espectro visible de la mezcla de reacción del lipopolisacárido de P. aeruginosa con el colorante presenta dos máximos de absorción a 640 y 472 nm, que unido a que en el microscopio electrónico se observan filamentos muy largos junto con otros más pequeños, con forma más ó menos vesicular, parece indicar un cierto paralelismo con los resultados de HIRT y VESTAL (1975). El lipopolisacárido de E. coli presenta, sin embargo, un solo máximo en la región de 472 nm, y el de B. melitensis dos, siendo el de 640 nm muy bajo. Este ultimo lipopolisacárido presenta al microscopio electrónico una proporción casi mayoritaria de formas filamentosas. También hemos comprobado una relación lineal entre la absorción a 472 nm y la concentración de los lipopolisacáridos de P. aeruginosa y E. coli, pudiendo utilizarse este método colorimétrico para la determinación de cantidades de lipopolisacáridos comprendidas entre 5 y 30 $\mu\text{g/ml}$ de mezcla de reacción. Para los lipopolisacáridos de S. minnesota (JANDA Y WORK, 1971) y M. faeni

(HOLLINGDALE, 1975), este ensayo tiene sensibilidad unicamente para soluciones de LPS con 1-10 $\mu\text{g/ml}$; sin embargo, para el de T. pallidum, los límites son de 5-40 $\mu\text{g/ml}$ (ZEY y JACKSON, 1973).

Este método colorimétrico para determinación cuantitativa de lipopolisacáridos nos resultó bastante útil, en todos los casos en que lo hemos ensayado, pero para obtener resultados reproducibles y poder hacer un estudio comparativo hay que controlar y fijar una serie de factores como son la exposición a la luz, los tiempos de preparación del colorante-reactivo y de incubación de la reacción (ya que se producen variaciones en la absorción a 472 nm) y, por último, el grado de purificación y naturaleza de la muestra. Como un intento de buscar nuevas posibilidades en estudios sobre espectroscopía molecular de endotoxinas acudimos a la resonancia magnética de protones. Nuestros resultados muestran claramente señales que se refieren más a la porción lipídica (grupos $-\text{CH}_2$ y metilos) que a la glucídica, ello es lógico si se tiene en cuenta la estructura de estas moléculas. En cualquier caso, estos estudios han servido para darnos cuenta de que, para conseguir resultados más significativos, es preciso disponer de un equipo más sensible y con más posibilidades analíticas (de 100 MHz y con un sistema CAT), en el que se puedan ir estudiando moléculas monoméricas o al menos oligómeros obtenidos mediante el empleo de detergentes.

En cuanto a las dimensiones moleculares de las distintas endotoxinas objeto de este estudio, hemos conseguido datos a partir de experiencias por cromatografía en gel y mediante ultracentrifugación. El hecho de que los lipopolisacáridos de P. aeruginosa (EDTA y fenol-agua), de S. typhi y B. melitensis se excluyan en Sepharosa 4B, nos induce a pensar que su peso molecular es muy alto, posiblemente mayor de 5×10^6 d. Existen varios LPS que se excluyen también en este gel, los de Shigella sonnei y Sh. flexneri (ROMANOWSKA, 1970), Y. pestis (HARTLEY y cols, 1974), Serratia marcescens (TSANG y COLS 1974), E. coli O111 : B4 (MORRISON y LEIVE, 1975) y los de S. typhi 0901 y S. typhi R₂ (RAYNAUD y cols, 1973) y sus pesos moleculares son de este orden. También hemos comprobado que al someter los lipopolisacáridos de P. aeruginosa (EDTA y fenol-agua) y el de B. melitensis a cromatografía en Sepharosa 2B se nos eluye la mayor parte del material en el Vo ($> 20 \times 10^6$ d), reteniéndose un resto. Este material restante parece que se trata de carbohidratos y pueden ser productos de la degradación del lipopolisacárido procedentes de sus cadenas laterales; asimismo se pudo comprobar una cierta heterogeneidad en ambas preparaciones -como la observada por TSANG y cols (1975)- y siendo esta menor en el caso de lipopolisacáridos de B. melitensis. Por otra parte se ha comprobado que los perfiles de sedimentación obtenidos con el lipopolisacárido de B. melitensis presentan un solo pico bastante simétrico, mientras que en el caso del lipopolisacá

rido de P. aeruginosa este pico no es tan simétrico, lo que parece indicar una cierta heterogeneidad en la muestra.

Los coeficientes de sedimentación ($s_{20,w}^0$) obtenidos por extrapolación a partir de la zona lineal a concentración 0, y corregidos frente a agua a 20°C, son de 65S y 19S para los LPS de B. melitensis y P. aeruginosa respectivamente. Asimismo, hemos comprobado que al aumentar la concentración del LPS disminuye el coeficiente de sedimentación, debido seguramente a alguna interacción entre las moléculas que se sedimentan (VAN HOLDE, 1971). Sin embargo, para concentraciones inferiores a los 3 mg/ml con el lipopolisacárido de B. melitensis ocurre lo contrario y así, al ir disminuyendo la concentración disminuye también el coeficiente de sedimentación; esto podría indicar un proceso de disociación originado a bajas concentraciones en el que la forma agregada da lugar a monómeros que originan tan solo un pico con un coeficiente de sedimentación, dependiente de la proporción de monómeros y polímeros. Cuando se opera a concentraciones más elevadas se favorece la aparición de la forma agregada y aumenta el coeficiente de sedimentación. Por tanto, aunque los perfiles dieron únicamente un solo pico, esto no nos parece un criterio suficiente para afirmar la existencia de homogeneidad, por la ya comentada dependencia que existe con la concentración.

Cuando hicimos una extrapolación aproximada de la zona no lineal -a baja concentración del LPS de B.melintensis- (19S) es muy proximo al valor obtenido con el lipopolisacárido de P.aeruginosa, lo que parece indicar que los tamaños básicos de ambos son los mismos y existiendo unicamente diferencias en sus niveles de agregación. También para justificar que los pesos moleculares son del orden de 2×10^6 d y 6×10^6 d en los lipopolisacáridos de P.aeruginosa y B.melintensis, respectivamente, -según datos obtenidos por cromatografía en gel y microscopía electrónica-, es necesario que tenga un coeficiente friccional relativo (f/f_0) de 3 en el primer caso (indicando una muy fuerte asimetría) y de 2 para el de 65S (indicando fuerte asimetría). Estos son los datos que se han obtenido con la ecuación de Svedberg, considerando una \bar{V} de $0,7 \text{ ml/g}$ (VAN HOLDE, 1971).

Los coeficientes de sedimentación ($s_{20,w}^0$) y pesos moleculares obtenidos para otros LPS son del orden de: 76,2S y $1,6 \times 10^8$ d para el de Y.pestis, (semejante a los datos de HARTLEY y cols, 1974); de 8,3S y $1,3 \times 10^6$ d con un f/f_0 de 6,8 para el de E.coli 0111:B4 (MORRISON y LEIVE, 1975); de 170S y $10-45 \times 10^6$ d con un f/f_0 de 2 para el lipopolisacárido de S.flexneri (HANNECART-POKORNI y cols, 1970a); de 63S, 6×10^6 d para el de S.typhimurium G-30 (WEISER y cols, 1968); de 70S y un f/f_0 de 2,5 para el de Azotobacter vinelandii (OLINS y WARNER, 1967) y de 17S y 1×10^6 d para el de S.enteritidis (RIBI y cols, 1966).

La heterogeneidad observada en los lipopolisacáridos de P. aeruginosa y B. melitensis se puede explicar, bien por encontrarse en distintos estados de agregación reversible -debido a interacciones hidrofóbicas ó ionícas- ó bien por una heterogeneidad química condicionada por un distinto grado de polimerización de las cadenas laterales. En este sentido, KOELTZOW y CONRAD (1971) encontraron dos fracciones en el LPS de Aerobacter aerogenus, una con cadenas laterales largas y otra de cadenas cortas; también HSU y CONRAD, (1970), obtienen fracciones de lipopolisacárido de S. typhimurium y S. anatum con diferentes tamaños de cadenas laterales y MORRISON y LEIVE (1975) y RYAN y CONRAD (1974) observaron este mismo fenómeno en los lipopolisacáridos de E. coli OIII : B4 y S. newington, respectivamente. Por último, en cuanto a la morfología, estudiada al microscopio electrónico, se ha podido comprobar que los lipopolisacáridos de P. aeruginosa y B. melitensis -teñidos positivamente- aparecen como estructuras acintadas ó filamentosas con algunas ramificaciones, unas largas y otras muy cortas (casi globulares), siendo mayor la proporción de estas últimas estructuras en el caso de los LPS de P. aeruginosa. El tamaño medio de las estructuras largas es aproximadamente de unos $830 \pm 80 \text{ \AA}$ de largo por $90 \pm 20 \text{ \AA}$ de ancho y las mas pequeñas -de aspecto globular- midieron unos $140 \pm 20 \text{ \AA}$ de diámetro. En algunas ocasiones, las cintas muestran una región delimitada por dos líneas externas paralelas, densas, de unos

70 Å de diámetro, como las que se han encontrado anteriormente en el lipopolisacárido de S. typhimurium (SHANDS y cols 1967) y en el de E. coli 018 (LOPES y INISS, 1970). Según hemos visto, SHANDS y cols (1967) han elaborado un modelo trilaminar para explicar esta estructura, según la cual el LPS tiene tendencia a orientarse en su superficie mas ancha, apareciendo estas líneas cuando el lipopolisacárido se apoya sobre su extremo más estrecho y dando lugar a una estructura de doble lámina que se puede observar con tinción positiva; según estos autores solo se tiñen el lípido y los polisacáridos centrales. También hemos comprobado que el calentamiento de la preparación de lipopolisacáridos de P. aeruginosa no produce ningún cambio apreciable de su estructura, que pueda señalarse al microscopio electrónico, en contra de lo observado por HANNECART-POKORNI y cols (1970a).

Los lipopolisacáridos de P. aeruginosa y B. melitensis, teñidos negativamente, al examinarlos al microscopio electrónico presentan una anchura de filamentos que es aproximadamente el doble que la observada en tinciones positivas. Los detalles estructurales que hemos visto se pueden interpretar mediante comparación con los tres modelos propuestos para este tipo de moléculas : el preconizado por SHANDS y cols (1969), y el de ROTHFIELD y HORNE (1967) y el de HANNECART-POKORNI y cols (1973). De acuerdo con el primer modelo, las dobles líneas que aparecen con la tinción negativa pudieran deberse a una orientación definida del

lipopolisacárido sobre su cara más delgada (cosa que parece poco probable), dando lugar a distintas formas de orientación según esté teñido positiva o negativamente. Por otra parte, ROTHFIELD y HORNE (1967), han interpretado las tinciones negativas de los lipopolisacáridos según el modelo expuesto en la introducción; según ellos, el lipopolisacárido está formado por una parte lipídica hidrofóbica y una parte de polisacáridos hidrofílica. Estas unidades de LPS se agrupan en forma de bicapa, con las partes lipídicas en el centro y las partes de polisacárido hacia el exterior. Así como el fosfotungstato sódico no llega a penetrar en la región hidrofóbica, deja una región central sin teñir, que aparece entre dos líneas paralelas de colorante. Las cadenas laterales de polisacáridos se encuentran a ambos lados del centro; el espacio entre estas cadenas es bastante pequeño, impidiendo la penetración del fosfotungstato sódico y dando lugar a una región ligeramente teñida a ambos lados de la zona central. Esta estructura parece ser bastante estable, ya que los grupos polares en la superficie protegen del medio acuoso extraño a los residuos hidrofóbicos internos. Otra posible explicación de las imágenes observadas con la tinción positiva, sería la de HANNECART-POKORNI y cols (1973), en la que como ya hemos visto suponen que las subunidades del lipopolisacárido se agrupan de forma micelar (con el lípido A en el centro) y dan lugar a la estructura bilaminar, que se ve al microscopio elec-

trónico de 50-100 Å de anchura.

Las imágenes al microscopio electrónico, obtenidas en este estudio con los lipopolisacáridos de P. aeruginosa y B. melitensis, indican que son morfológicamente muy similares a los de otras especies anteriormente estudiadas, que son de forma acintada, y con una anchura de unos 90 Å. Estas especies son : E. coli (BEER y cols 1966; LOPES e INISS, 1970; MC INTIRE y cols, 1967; MERGENHAGEN y cols 1966; RIBI y cols 1966; RUDBACH y cols 1966; WEIDEL y cols, 1960), S. typhimurium (ROTHFIELD y HORNE, 1967; SHANDS y cols, 1967; LOPES e INISS, 1970), Treponema pallidum (JACKSON y ZEY, 1973), Bordetella pertussis (RIBI y cols, 1966), Y. pestis (HARTLEY y cols, 1974) y Thermoplasma acidophilum (MAYBERRY-CARSON y cols, 1975). Finalmente si consideramos que el volumen específico parcial (\bar{V}) de los lipopolisacáridos de P. aeruginosa y B. melitensis es de 0,7 ml/gr y tenemos en cuenta las dimensiones calculadas mediante las electron-microfotografías, se puede calcular un peso molecular aproximado de $8,6 \times 10^6$ y 2×10^6 respectivamente. El valor de \bar{V} , utilizado para estos cálculos, es un valor medio de los obtenidos con otros lipopolisacáridos como los de Azotobacter vinelandii (OLINS y WARNER, 1967), S. typhimurium (WEISER y ROTHFIELD, 1968), E. coli O111 : B4 (MORRISON y LEIVE, 1975), Y. pestis (HARTLEY y cols, 1974), S. flexneri (HANNECART-POKORNI y cols, 1970b), S. enteritidis (RIBI y cols, 1966), E. coli K-235 (MCINTIRE y cols 1967) y S. typhimurium y S. minnesota (HANNECART-POKORNI y cols, 1973).

3) En cuanto a las actividades tóxicas observadas en los LPS de Gram-negativos.

Como se puede ver en el capítulo de Resultados la toxicidad de las moléculas endotóxicas estudiadas se ha controlado mediante ensayos para determinación de DL_{50} , pirogenicidad y capacidad de hipersensibilización. Así hemos podido comprobar que la toxicidad de los LPS de P. aeruginosa (EDTA y fenol-agua) B. melitensis, Y. enterocolitica, B. abortus y E. coli -medida en función de sus DL_{50} - fué muy similar en todos los casos, resultando ser los más tóxicos los de E. coli y Y. enterocolitica. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos para el lipopolisacárido de E. coli O111: B4 (MORRISON y LEIVE 1975) y el de B. abortus (LEONG y cols 1970). También el lipopolisacárido de S. marcescens tiene una DL_{50} para ratón de 450 μ g (TSANG y cols, 1974), que es del mismo orden que las toxicidades obtenidas por nosotros para los lipopolisacáridos estudiados.

Nuestros resultados, sin embargo, no están de acuerdo con los de RENOUX y cols (1973), debido a que estos autores, estudiando las endotoxinas B. abortus y B. melitensis, no han encontrado una actividad letal en ratón ni con 2mg/animal; posiblemente sea porque ellos ensayan la toxicidad mediante inyección subcutanea .

Por otra parte, se ha comprobado que cuando el ensayo con lisado de amebocitos de Límulus dá resultados positivos existe un cierto grado de pirogenicidad en la preparación endotóxica (COOPER y cols, 1971); resultando, además, que esta prueba está relacionada con un inmunoensayo y con un test cutáneo de epinefrina para endotoxinas biológicamente activas (ROJAS-CORONA y cols, 1969). Este tipo de ensayo biológico nos dió positivo con los tres lipopolisacáridos estudiados, el de P. aeruginosa (fenol-agua), B. abortus y E. coli, detectándose cantidades activas de endotoxina equivalentes a 0,05 µg/ml, en todos los casos. Las muestras de polisacáridos de E. coli usadas como control dieron reacción negativa, mientras que las de polisacáridos de P. aeruginosa dieron una reacción muy debilmente positiva, debido seguramente a una contaminación de endotoxina. Como el LPS de P. aeruginosa (EDTA) presentaba unos valores debilmente positivos con este ensayo, realizamos también un estudio comparativo de las variaciones de temperatura en conejos mediante inyección intravenosa de los lipopolisacáridos de P. aeruginosa (EDTA y fenol-agua). Estudiando esta reacción en función del tiempo, vimos que a las tres horas y media se obtenia un aumento máxímo de temperatura de 2,2 y 1,6°C para el lipopolisacárido de P. aeruginosa extraído con EDTA y para el extraído con fenol-agua, respect

tivamente. (Indices pirogenicos (FI) * de 40 y 38 respectivamente). El control con polisacáridos dió tan solo elevación de temperatura, a los 90 minutos con un máximo de 0,25°C.

Comparados estos resultados con los obtenidos por LEONG y cols (1970), con el lipopolisacárido de B. abortus 2308, se observa que la endotoxina de P. aeruginosa es más activa pirogenicamente para conejos ($FI_{40} = 0,3$ mg) que la de B. abortus ($FI_{40} > 0,3$ mg). Sin embargo, la de E. coli 0111 : B4 es mucho más potente en este bioensayo. RIBI y cols (1966) dan para las endotoxinas de S. enteritidis, B. pertussis y E. coli un FI_{40} de 0,25 µg, 0,6 µg y 0,2 µg respectivamente, lo que parece indicar que nuestras preparaciones no son muy pirogénicas, comparativamente consideradas; estas diferencias quizá estén condicionadas por variaciones en el grado de purificación.

En cuanto a la capacidad de hipersensibilización, no se logró obtener hipersensibilización en ratón con el

* FI es el área en cm^2 existente bajo la curva de la respuesta pirogénica dibujada, con unas escalas tales que 1°C y 1 hora se representan por 1 pulgada. La dosis de endotoxina que da un índice pirogénico de 40 está en el centro de la relación lineal de la curva de respuesta febril a distintas dosis. (RIBI y cols, 1966).

lipopolisacárido de P. aeruginosa; quizá se hubiera logrado una respuesta positiva produciéndose primeramente una infección subletal con P. aeruginosa, seguida de inyección i.v. de lipopolisacárido. Con B. melitensis otros autores han comprobado esta capacidad hipersensibilizante (ABERNATHY y cols, 1958, RENOUX y cols, 1973).

La variabilidad quizá sea debida a las posibilidades de conseguir una infección subletal previa, ya que según hemos visto en la bibliografía, cuando se confiere una inmunidad frente salmonella por infección subletal con bacterias virulentas, esta inmunización con bacterias vivas hace a los ratones más sensibles que los animales sometidos a la acción letal de la endotoxina extraída de estas mismas bacterias (KAWAKAMI, 1973)

4) Sobre las endotoxinas como inmunógenos y la posibilidad de transmitir esta inmuno-respuesta específica anti-LPS.

El lipopolisacárido de P. aeruginosa ha resultado ser un buen inmunógeno, tanto en ratón como en conejo. En el primer caso se estudiaron las variaciones en la respuesta humoral primaria frente a distintas dosis de LPS, inyectados intraperitonealmente, eligiéndose la de 30 µg por ratón como óptima. En la respuesta humoral primaria frente a esta dosis de LPS, se detectan dos máximos de anticuerpos; uno que aparece hacia el séptimo día y otro alrededor del 12. Para el estudio de esta respuesta, los métodos más sensibles resultaron ser los de hemaglutinación pasiva

y, principalmente, inmunohemolisis de eritrocitos marcados con $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$. Los anticuerpos del primer máximo son sensibles a la reducción por β -mercaptoetanol (anticuerpos IgM); mientras que los del segundo, no se alteran visiblemente por este tratamiento (7s). El máximo número de células formadoras de anticuerpos IgM aparece al sexto día después de la inyección de antígeno. La inmunización de conejos frente al lipopolisacárido de B. melitensis y P. aeruginosa dió lugar a títulos de aglutininas de 5120 y 2560 respectivamente, siendo estos anticuerpos sensibles a la reducción con β -mercaptoetanol y disminuyendo el título hasta 10. Por lo tanto, en ratón se obtiene una respuesta en anticuerpos 19S y 7S, mientras que en conejo solo 19S. LEONG y cols (1970) y DIAZ y cols (1970) han observado que los lipopolisacáridos de B. melitensis, B. abortus y Y. enterocolitica (F_5) son altamente inmunogénicos en conejo y HURVELL (1973) obtiene una respuesta, también en conejos frente a LPS de B. abortus y Y. enterocolitica, de anticuerpos 19S y 7S, HOLLINGDALE (1975) ha comprobado que el lipopolisacárido de M. faeni induce la síntesis de anticuerpos IgM y quizás IgA en animales, mientras que en humanos produce IgG, IgA e IgM. No se conocen las razones por las que en algunos casos se obtienen producción solamente de IgM, y en otros aparecen además otros tipos de inmunoglobulinas.

WATSON y RIBLET (1975) obtienen con los lipopolisacáridos de E. coli 0127 : B8 una respuesta máxima en células formadoras de anticuerpos con 10 μg /ratón y tan solo

encuentran una respuesta de IgM, de acuerdo con lo que encuentran SKIDMORE y cols (1974) y FRIEDMAN (1973), con los lipopolisacáridos de E. coli O111 : B4 y Shigella paradysenteriae.

Con una dosis de 50 μ g de lipopolisacárido de P. aeruginosa / ratón no se obtuvo respuesta humoral detectable; esto puede deberse, según comunicación personal de COUTINHO, a que -en esas dosis- el lipopolisacárido dejó de ser inmunogénico para empezar a funcionar como mitógeno, ya que no se han observado inmunotolerancias con bajas dosis de antígenos T-independientes del tipo LPS. Esto, sin embargo, no explica el que obtuvieramos respuestas con dosis más elevadas de LPS (100 y 200 μ g).

En general, cabe decir que entre las perspectivas de estudios inmunobiológicos relacionados con las moléculas endotóxicas, es difícil establecer las relaciones que existen entre fenómenos tales como inmunogénesis, mitogénesis e inmunosupresión; aunque sí sabemos que los lipopolisacáridos, y otros antígenos T-independientes (flagelina polimerizada etc.), debido a su señal mitogénica, intrínseca, pueden sustituir los factores T y son capaces de inducir una immuno-respuesta primaria -frente a antígenos T-dependientes (eritrocitos de carne-ro)- en ausencia de células T tanto "in vivo" como "in vitro" (ANDERSSON y col, 1972 y WATSON y cols 1973). Por

su parte, MÖLLER y cols (1973) -y también otros autores sugieren que en las respuestas frente a lipopolisacáridos generalmente se producen anticuerpos IgM; mientras que FELDMANN y BASTEN (1971) habían observado que la dependencia o no dependencia de linfocitos T, no se debe a la naturaleza de los grupos inmunodeterminantes del antígeno sino al grado de polimerización, a la morfología física y a su presentación. En el caso de la flagelina polimerizada, se obtiene una respuesta inmune "in vitro" que es T-independiente y con producción de anticuerpos IgM; mientras que cuando está en forma de monómero la respuesta inmune es T-dependiente, con producción de anticuerpos IgM é IgG. En las respuestas "in vivo" se forman tan solo IgM debido a que la molécula endotóxica se polimeriza.

Por otra parte, existen una serie de autores que sugieren que tanto el efecto coadyuvante del lipopolisacárido sobre las respuestas anti-antígeno "in vitro" e "in vivo", como las respuestas en anticuerpos frente a LPS de las células B en cultivos, son dependientes de la presencia de células T y en algunos casos de macrófagos. (DRESSER, 1972; DRESSER y PHILLIPS, 1974; ARMERDING y KATZ, 1974; UNANUE y cols, 1969; NAKANO y cols 1973; ALLISON y DAVIES, 1971; NEWBURGER y cols, 1974; KAGNOFF y cols, 1974; SHEID y cols, 1973).

En nuestro caso, obtenemos una inmuno-respuesta primaria en ratón, frente al lipopolisacárido de P. aeruginosa, con producción de anticuerpos 19S y 7S. La aparición de estos dos tipos de anticuerpos quizá se pudiera explicar como una consecuencia de la activación, efectuada por el LPS, de linfocitos B con la participación de T; o también, que fuera debida a la independencia de las células T para sintetizar ambos tipos de inmuno globulinas.

Con la primera posibilidad, quizá podríamos explicar la ausencia de respuesta obtenida con dosis de 50 µg de LPS por ratón; ya que según MÖLLER y cols (1973), la tolerancia a dosis bajas afecta a las células T, mientras que a dosis altas afecta a ambos tipos de linfocitos según estos autores, los antígenos T-independiente, tan sólo son capaces de inducir la tolerancia a dosis elevadas. En los animales tolerantes, los receptores para LPS, se hallan bloqueados de una forma inmuno lógicamente específica, bien por el antígeno, por el anticuerpo o por ambos.

También, en relación con este problema, KEARNEY y LAWTON (1975) han observado recientemente, que el lipopolisacárido, en condiciones adecuadas de cultivo, es capaz de inducir la diferenciación de células productoras de IgM, IgG e IgA de un modo que, al parecer, es independiente de las células T. Esto resulta en claro contraste con los datos de otros autores, en los que se preconiza que la respuesta "in vivo" en IgG e IgA

es dependiente de la presencia de linfocitos T funcionales y que, generalmente, no ocurre después de la inyección de antígenos T independientes; ello es debido, seguramente, a que estos antígenos no pueden activar los precursores por falta de una señal apropiada de la células T.

Probablemente, la única forma de dilucidar claramente las incertidumbres e imprevisibilidad que existen en las respuestas inmunogénicas frente a LPS sea acudir al estudio de la interacciones entre anticuerpos específicos y componentes moleculares definidos del LPS utilizando sistemas de respuesta bien caracterizada, tanto "in vivo" como "in vitro".

Según nuestros resultados, también se ha observado que el tratamiento previo con Indometacina disminuye la immuno-respuesta primaria, en ratón, frente a lipopolisacárido de P. aeruginosa, produciendo una disminución en los títulos de anticuerpos humorales, de idéntica forma a como se inmunodeprime la respuesta primaria frente a eritrocitos de carnero, con la misma dosis y pauta de administración del antiinflamatorio. Esta actividad podría ser debida a la acción del fármaco sobre la síntesis de prostaglandinas (FERREIRA Y VANE, 1974) y consecuentemente también a los niveles de CAMP (BOURNE y cols (1974), posibilidad que no excluye otras vías de actuación.

En cuanto a la transmisión de la información inmunitaria con RNA crudo de donantes inmunizados frente a LPS, son muy distintas las experiencias realizadas para conocer el papel que las distintas preparaciones (RNA o complejos antígeno-RNA) pueden tener en las interacciones inmunitarias -según han revisado GOTTLIEB y SCHWARTZ (1972) y UNANUE (1972)-, pero la principal dificultad para evaluar estas interacciones de transferencia inmunológica es conocer: en unos casos, si las preparaciones de RNA están totalmente exentas de material antigénico; y en otros, qué proporción de inmunógeno existe en los posibles complejos antígeno-RNA formados; o también, su grado de disociación.

En cualquier caso, hasta la fecha, existen muy pocas experiencias de este tipo donde se utilicen como antígeno moléculas de LPS, que puedan dar lugar a otros fenómenos de carácter particular, y que estén condicionados por la posibilidad de tolerancia inmunológica y por las propiedades mitogénicas que tienen estas preparaciones endotóxicas. Hasta ahora, tan solo FRIEDMAN y LANDY (1971) obtienen algunos resultados con el antígeno somático de E. coli y -en otros estudios- con los antígenos de Shigella (FRIEDMAN; 1964, 1966 y 1973), inyectando intraperitonealmente extractos de RNA de animales inmunizados en donantes no inmunes; pero, pese al interés clínico del género Pseudomonas, ningún dato ha apa

recido referente a las endotoxinas de estas especies bacterianas.

En nuestro caso particular, los datos que hemos obtenido parecen indicar que los extractos de RNA purificados a partir de animales inmunizados son bastante inmunogénicos para los animales receptores. La cinética de la respuesta es muy similar a la respuesta en ratón frente al antígeno únicamente, aunque su magnitud es algo menor, y se adelanta un día. El extracto de RNA utilizado en la inmunización no poseía antígeno detectable por inmunoprecipitación. Además, su inmunogenicidad no parece ser debida a una posible contaminación con antígeno (en cantidades muy pequeñas) ya que los RNA extraídos el día 3 después de la inyección de LPS no tienen capacidad inmunogénica, al igual que el RNA de animales inyectados con 50 μ g de lipopolisacárido. De todas formas, no se puede descartar completamente la posibilidad de que el ácido nucleico actúe como coadyuvante de pequeñas cantidades de antígeno que pudieran existir en la preparación, ya que según es sabido los complejos de antígeno y RNA estimulan o incrementan las respuestas inmunológicas si se compara con una cantidad equivalente del antígeno por separado (GOTTLIEB y SCHWARTZ, 1972) y algunos autores como ROELANTS y cols (1971) han observado que no solamente el RNA de macrófagos es capaz de formar complejos con los antígenos.

Esta cuestión podría ser dilucidada de una manera más definitiva utilizando preparaciones puras de mRNA en vez de preparaciones crudas de RNA, dado que experimentos similares con extractos de linfocitos llevados a cabo por BELL y DRAY (1970), sugieren una función de mensajero en el extracto de RNA. Sin embargo, estos resultados no se han podido reproducir por otros autores (BLUESTEIN y cols, 1970) y necesitan posterior confirmación.

Nuestros resultados están de acuerdo con lo obtenido por FRIEDMAN (1973) en unos experimentos con el lipopolisacárido de Shigella paradyenteriae.

5) Sobre la inmunosupresión de carácter endotóxico a nivel celular y humoral.

Según hemos recogido en la parte bibliográfica las moléculas de lipopolisacárido, independientemente de que sean capaces de incrementar la respuesta inmune también pueden suprimirla y, según parece, el lípido A es el responsable de esta actividad (SCHWAB, 1975). Así se ha podido observar que cuando se administra LPS, uno o dos días antes que un antígeno, se suprime la respuesta en anticuerpos humorales que depende de células T, tanto en sistemas "in vivo" como "in vitro" (JOHNSON y cols, 1967; FRANZL y McMASTER, 1968; McMASTER y FRANZL, 1968; HOFFMANN y cols, 1975); sin embargo, cuando el LPS se administra poco tiempo después que el antígeno, entonces

se puede estimular la inmuno-respuesta.

Como se puede ver en nuestros resultados, la actividad inmunosupresora del lipopolisacárido de P. aeruginosa -sobre la respuesta en anticuerpos humorales frente a lisozima en conejo- la controlamos y medimos mediante un sistema inmunológico enzima-anti-enzima de gran sensibilidad y sencillez. Nuestros datos indican que el lipopolisacárido inyectado intravenosamente, dos días antes de la administración del antígeno (lisozima) y a los 14 días de comenzado el tratamiento inmunizante con el enzima, da lugar a un descenso dramático en los títulos de anticuerpos humorales anti-lisozima.

Muchas y muy diversas pueden ser las explicaciones posibles de esta acción de las endotoxinas bacterianas sobre la respuesta inmune: 1) por una competición antigénica timo-dependiente, debida a una sustancia inhibidora no específica, que se libera a partir de timocitos estimulados (GERSHON, 1974) ó a complejos IgT-antígeno que se unen a ciertos receptores de macrófagos, evitando que otros complejos de este tipo se unan al receptor; 2) por un efecto linfotóxico sobre los linfocitos T (McMASTER y FRANZL, 1968); 3) porque células B, parcialmente estimuladas a diferenciarse por la unión de C_3 en presencia de LPS quedan desfasados para iniciar una nueva respuesta frente a otro antígeno dando lugar a una

supresión (SCHWAB, 1975); 4) porque el lipopolisacárido puede suprimir la producción de anticuerpos dependiente de células T, evitando que las células B puedan recibir señales de estas células T ó que las células encargadas del reconocimiento celular no puedan efectuar un contacto adecuado (HOFFMANN, 1975); 5) porque el lipopolisacárido "in vitro" -y no se sabe si también "in vivo" -induce a una diferenciación precoz de las células B precursoras a células productoras de anticuerpos en un estadio celular terminal, sin capacidad de renovación. En algunas ocasiones la inmunosupresión solo ocurre cuando se incuban juntos el antígeno y la endotoxina (WHANG y cols, 1965), pero no es este nuestro caso.

En cuanto a la actividad en inmunidad celular, hemos comprobado que los lipopolisacáridos de P. aeruginosa, B. abortus, y E. coli producen un efecto inmunodepresor sobre la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales de ratón, tanto "in vivo" como "in vitro". La máxima inhibición de la capacidad fagocítica "in vitro" -frente a células de Staphylococcus- se obtuvo con la endotoxina de P. aeruginosa, seguida de la de E. coli y B. abortus, disminuyendo los índices fagocitarios -a las 3 horas después del comienzo de la reacción celuloatrópica- desde un valor de 6,5 en ratones no tratados hasta 2,7; 3,7 y 4,7, según que utilicemos el LPS de P. aeruginosa, E. coli y B. abortus, respectivamente. La acción inhibitoria "in vivo" de estas endotoxinas sobre la respuesta de macrófagos peritoneales

de ratón contra infecciones estafilocócicas es también muy acentuada. Los imacrófagos de animales previamente vacunados, también se afectan, aunque en menor grado, por la acción inmunodepresora de las endotoxinas.

Varios autores han observado que los lipopolisacáridos y otros metabolitos bacterianos tienen efectos citotóxicos sobre los macrófagos peritoneales, tanto "in vivo" como "in vitro", interfiriendo quizás en su metabolismo normal (WEINER, y LEVANON, 1968; PEREZ-UREÑA y cols, 1972; SHANDS y cols, 1974), mientras que otros, paradójicamente observan que los lipopolisacáridos producen aumentos en la actividad fagocítica del sistema retículo-endotelial (CLUFF y cols, 1970)

6) Sobre otras acciones endotóxicas de carácter inmunobiológico, mitogénesis e interacciones LPS-virus.

Como es sabido, el término "mitógeno" se aplica en Inmunología a sustancias de muy diverso origen que tienen la facultad de estimular los linfocitos; dicha estimulación consiste en un incremento del metabolismo y síntesis de DNA, desarrollo de transformación blástica y -en algunas ocasiones- mitosis (QUINTANS, 1974). Para algunos autores (GRONOWICZ y COUTINHO, 1974), la

estimulación mitogénica es similar a las respuestas inducidas por un antígeno, debido a que el resultado de ambas activaciones es el mismo, proliferación celular - seguida de diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos (aunque en el primer caso la activación es policlonal). De aquí que sea posible utilizar la mitogénesis como un modelo para el estudio de mecanismo que opera durante la inducción de células inmunocompetentes. Según PEAVY y cols (1974), los lipopolisacáridos son mitógenos de células B y estimulan la síntesis de DNA en una respuesta policlonal.

En nuestro trabajo, hemos ensayado la capacidad mitogénica de los lipopolisacáridos de P. aeruginosa y B. melitensis, sobre cultivos de células de bazo de ratón y la hemos comparado con la del sulfato de dextrano, mitógeno específico de células B (DIAMANTSTEIN y cols, 1973) y con la fitohemaglutinina y concanavalina A, que son mitógenos de células T (ANDERSSON y cols, 1972). La actividad mitogénica se ha determinado midiendo los aumentos en la incorporación de ^3H -Timidina de las células de cultivo.

Con el lipopolisacárido de P. aeruginosa se obtuvieron unos niveles de máxima estimulación con 10 $\mu\text{g/ml}$, mientras que con el de B. melitensis, la concentración óptima fué de 100 $\mu\text{g/ml}$ alcanzándose niveles de incorporación de ^3H -Timidina algo mas bajos. Al comparar estos resultados con los que obtuvimos para las sustancias pa-

trón de mitogénesis, nos encontramos con que la conca-navalina A, la fitohemaglutinina y el sulfato de dextrano produjeron una máxima estimulación a las dosis de 5,10 y 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. En el caso de los lipopolisacáridos, la incorporación máxima de ^3H -Timidina se realizó al segundo día del cultivo, mientras que con la conca-navalina A el máximo se alcanza el tercer día. Estos resultados están bastante de acuerdo con los obtenidos por WATSON y RIBLET (1975) para los LPS de S. abortus, S. flexneri, S. marcescens, S. typhimurium, S. typhosa S. paratyphi c y E. coli, ya que en estos casos se obtuvieron máximos de estimulación con dosis muy aproximadas a los 10 $\mu\text{g/ml}$.

COUTINHO y cols (1973) y SKIDMORE y cols (1975) obtienen con el lipopolisacárido de E. coli, un máximo de incorporación al segundo día de cultivo y con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Parece probable que los nucleótidos cíclicos estén implicados en la regulación de la proliferación de linfocitos, tanto si ésta se efectúa por antígenos o por la intervención de la acción de mitógenos (PASTAN y cols 1975).

En cuanto a las interacciones LPS-virus éstas fueron observadas a través de ensayos sobre la producción de interferón y por intentos de buscar alguna acción anti-

tumoral. En el primer caso, se sabe que la producción de interferón es un mecanismo de defensa de las células animales frente a una infección viral, aunque esta producción de interferón pueda ocurrir también en presencia de endotoxinas, -debido al lípido A- (HO, 1964; POSTIC 1973), por la acción de mitógenos como fitohemaglutinina y concanavalina A (WALLEN y cols, 1974), y también en cultivos mixtos de linfocitos de ratón y en procesos de inmunización primaria frente a eritrocitos xenogéneos (SVET-MOLDAVSKY y cols, 1974).

Nuestros resultados indican que los lipopolisacáridos de P.aeruginosa y B.melitensis, al inyectarlos (por vía intravenosa) en pollos a la dosis de 0,1 µg son capaces de inducir la producción de interferón, alcanzándose unos niveles máximos a las 4-6 horas después de la inyección. Cuando estos niveles de interferón, se comparan con los que obtuvimos al utilizar el virus NDV como inductor, resultaron ser del orden de la mitad. El LPS de B.melitensis produce unos niveles más bajos que el de P.aeruginosa.

Por otra parte, antibióticos tales como la Rifamicina SV y la Rifampicina -que actúan bloqueando la RNA-polimerasa dependiente de DNA en células de mamíferos

(WEHRLY y cols, 1968, JUHASZ y cols, 1972)- inhibieron la producción de interferón inducida por el NDV y por los lipopolisacáridos de P. aeruginosa y B. melitensis. La máxima inhibición se produjo cuando se inyectó el antibiotico, por vía intravenosa y a la dosis de 0,5 µg/100 gr. de peso, cuatro horas después que los inductores. Asimismo se ha comprobado que los interferones inducidos por virus fueron más sensibles a esta inhibición y que el interferón inducido por el lipopolisacárido de P. aeruginosa era más resistente que el originado por B. melitensis.

YOUNGER (1970) también obtuvo una producción de interferón con diversos lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas; sin embargo, en el caso de los LPS del género Brucella, en algunas ocasiones no se consiguió producción de interferón a no ser que se utilizaran bacterias muertas (DE SOMER y cols. 1970); KELETI y cols (1974), aunque obtienen producción de interferón -en ratones- pero inyectando intravenosamente 200 µg de lipopolisacáridos de B. abortus, para alcanzar el máximo de estimulación a las 2 horas mientras que con el lipopolisacárido de S. typhimurium, la inducción de interferon se produce a dosis tan bajas como 0,1 µg/20 g de peso.

Los lipopolisacáridos ensayados por nosotros en pollos, dieron una respuesta mas tardía que la publicada por estos autores, era del tipo de la inducida por virus y se alcanzaron niveles séricos de interferón que resultaron más elevados. Se ha comprobado que los inhibidores de síntesis de RNA mensajero afectan a esta producción, tanto en el caso del virus como con los lipopolisacáridos, aunque en el primer caso esta inhibición es algo mayor; ello parece indicar que el mecanismo de inducción en todos los casos podría ser semejante en alguna de sus fases.

Finalmente, en cuanto a la acción antitumoral o posibles relaciones de las moléculas endotóxicas con virus cancerígenos, nos encontramos con que los lipopolisacáridos de P. aeruginosa, E. coli, B. melitensis, y S. typhi no presentan ninguna acción citotóxica sobre el crecimiento del mastocitoma P815 de ratón DBA/2 -cultivado "in vitro"-, aunque las dosis empleadas fueron bastante altas. Por falta de ratones suficientes, de esta estirpe, nos fué imposible estudiar la acción de estos lipopolisacáridos sobre el crecimiento del tumor "in vivo" como hubiera sido nuestro deseo para poder comparar mejor nuestros resultados con los de otros autores como YANG y NOWOTNY (1974), quienes estudiando la acción antitumoral "in vivo" de la endotoxina de

S. marcescens (extraída por el procedimiento de Boivin) observan que la máxima inhibición del carcinoma ascítico de ratón (TA3-HA) se obtiene con 10 µg de endotoxina, inyectadas 3 días antes y simultáneamente con la inoculación del tumor; sin embargo, estos autores, no observaron efecto citotóxico directo con esta endotoxina, al incubar las células tumorales durante 5 horas. ALEXANDER y EVANS (1971), por otra parte, comprobaron que las endotoxinas no inhibían el crecimiento de linfomas "in vivo". Estas diferencias "in vitro" e "in vivo" podrían explicarse porque los tumores usados en todos estos casos, incluido el nuestro, están en forma ascítica y no existe vascularización que permita a la endotoxina originar daños a nivel vascular. RALPH y NAKOINZ (1974), sin embargo, han demostrado la inhibición -tanto "in vivo" como "in vitro"- de dos tipos de tumores: por el lipopolisacárido de S. typhosa; se trató de un linfosarcoma y un linfoma espontáneo de células B (PV-5-1.8) de ratones BALB/C (RAW 8) y observaron que, tanto el LPS de E. coli como el lípido A obtenido de este, presentaban propiedades antitumorales; ello parece estaren contraposición con los resultados de HOSHI y cols (1972), al observar que únicamente se obtiene acción antitumoral "in vivo" frente a varios tumores (Sarcoma 180, carcinoma ascítico de Ehrlich y adenocarcinoma -⁷⁵⁵), si se

utilizan preparaciones endotóxicas con radicales proteicos (Pr-LPS), mientras que los lipopolisacáridos típicos (LPS) no presentan esta acción.

RALPH y NAKOINZ (1974) no han observado acciones inhibitorias con S. typhosa (ni "in vivo" ni "in vitro") sobre otros tumores murinos del tipo linfomas T o mielomas, ni tampoco el mastocitoma P815, utilizado por nosotros. Por otra parte, el hecho de que-según estos autores- la fitohemaglutinina (mitogeno de células T) sea capaz de inhibir el crecimiento de linfomas de células T, nos lleva a suponer que la acción antitumoral de los LPS pudiera explicarse quizá, por una señal mitogénica de la molécula endotóxica sobre las células tumorales en rápida división (linfoma de células B) de tal forma que pudieran diferenciarse en células terminales con capacidad para dividirse nuevamente, mientras que no tienen acción alguna sobre tumores no derivados de células B.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En la presente Memoria se han recogido numerosísimos datos sobre estudios relativos a la significación biológica de las endotoxinas bacterianas. Los antecedentes bibliográficos se refieren tanto a la localización celular de estas macromoléculas -en las estructuras periféricas bacterianas- como a su aislamiento y purificación; también se recogen y comentan diferentes datos relativos a la estructura física y a su composición química.

En cuanto a la gran versatilidad de acciones endotóxicas encontradas éstas pueden examinarse desde tres importantes puntos de vistas: a) por una parte, a través de cambios metabólicos y endocrinos, así como por las alteraciones que se producen en el cuadro hematológico normal, en el mecanismo de termo-regulación y en el sistema cardiovascular; b) por otras -en lo relacionado con el sistema inmunitario de defensa- se revisan los distintos mecanismos de la inmuno-respuesta normal y se consideran -a través de numerosos resultados- las posibles interacciones de la endotoxina con el sistema complemento, con la inmunidad celular y con la resistencia inespecífica

del huesped, así como la variabilidad de acciones inmunogénica, inmunocoadyuvante e inmunosupresora; y c) finalmente, también se han revisado abundantes resultados relativos a la correlación entre actividades mitogénica, inmunogénica e inmunocoadyuvante así como con las interacciones endotoxina-virus a través de distintos sistemas biológicos.

De este modo, al actualizar el tema, se ha comprobado que la síntesis de algunos componentes de las moléculas endotóxicas se efectúa en la membrana y luego se desplazan, en forma de LPS, por el espacio periplásmico hasta la membrana externa y se unen a ella por sus caras limitantes, quedando asociadas la porción del lípido A con las zonas hidrofóbicas de la membrana. Estas moléculas endotóxicas intervienen en la permeabilidad celular frente a antibióticos, lisozima y actividades específicas immunohemolíticas y pueden funcionar como receptores de fagos por medio de los azúcares terminales del LPS.

Asimismo, se ha visto que existen distintos métodos de extracción y purificación, pero no encontramos ningún criterio normalizado de pureza, ateniéndose tan solo a la ausencia de materiales citoplásmicos y, ocasionalmente, a la homogeneidad cromatográfica; ésto puede originar algún confusiónismo en la interpretación de resultados, sobre todo en experiencias immunoquímicas o en aquellas en las que las endotoxinas aparecen usadas como antígenos.

Se citan diversidad de tamaños que, en ocasiones, no son datos totalmente concordantes; pero donde mayor diversidad de opiniones existe es en lo relativo a la naturaleza (hidrofóbica o ionica) de la agregación de este material polidisperso.

En cuanto a las actividades biológicas de las endotoxinas se describe, por una parte, una fenomenología que afecta al normal fisiologismo del huésped; en estos datos no parecen existir controversias, pero sí se aprecia la falta de estudios comparativos entre moléculas endotóxicas de distinto origen. Por otra parte, existen gran número de resultados, relativos al comportamiento de los LPS en el sistema inmunitario de defensa y en diferentes interacciones huésped-parásito a nivel molecular, que merecen ser estudiadas con mas detalle por la diversidad de opiniones que existen y que, en muchos casos, están originadas por diferencias metodológicas en la obtención y purificación del material endotóxico o en el planteamiento experimental aplicado.

De aquí que, para un mejor conocimiento del problema presentado por las endotoxinas en el estudio de interacciones huésped-parásito, hayamos intentado aportar algunos datos mediante:

a) Un estudio comparativo en la obtención de endotoxinas, a partir de distintas bacterias gram-negativas, utilizando tres métodos distintos.

b) Un examen comparativo de diversos métodos de purificación basados, principalmente, en la separación del material endotóxico por sedimentación, ultrafiltración y separación cromatográfica en gel.

c) Obtención de endotoxinas marcadas con ^3H y con ^{51}Cr y examen de sus posibilidades de aplicación a estudios biológicos "in vivo".

- d) Control, mediante diversos métodos espectroscópicos, del grado de pureza de los LPS bacterianos obtenidos.
- e) Estudio comparativo de los espectros IR de LPS procedentes de distintas bacterias gram-negativas.
- f) Un examen previo, de las posibilidades de aplicación de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, para estudios de interacción molecular con moléculas endotóxicas.
- g) Aplicación de un método espectrocolorimétrico a la determinación cuantitativa de LPS bacterianos en soluciones.
- h) Estudio comparativo de algunas características hidrodinámicas de diferentes muestras endotóxicas para conocer algunos datos sobre el tamaño molecular.
- i) Examen comparativo, al microscopio electrónico, de la morfología de los LPS procedentes de B. melitensis y P. aeruginosa.
- j) Determinaciones de pirogenicidad y del grado de toxicidad -mediante las DL_{50} - de las distintas endotoxinas estudiadas.
- k) Determinación del grado de mitogenicidad de los LPS de Brucella y Pseudomonas, por su capacidad estimuladora de la incorporación de timidina, en células de bazo de ratón.

l) Estudios de inmunogénesis, determinando la dinámica de una inmuno-respuesta homoral primaria anti-LPS -en ratones- y la posible existencia de reacciones de hipersensibilización inmunitaria. En el primer caso, se adaptó una técnica de gran sensibilidad, basada en la inmunohemolisis específica de eritrocitos LPS-sensibilizados y marcados con $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}$.

Asimismo, se ensayaron las variaciones de esta inmuno-respuesta primaria en presencia de indometacina, anti-inflamatorio no corticoide que según se ha visto puede actuar como inmunodepresor; comparandolo con la variación que produce este mismo antiinflamatorio en la inmunorespuesta primaria frente a hematíes de carnero.

m) Ensayos de actividad fagocitaria "in vivo" e "in vitro" para conocer las variaciones de la inmuno-respuesta celular condicionadas por la presencia de endotoxinas.

n) Determinación de la capacidad inmunosupresora mediante un sistema inmunológico enzima-antienzima de gran sensibilidad basado en la acción lítica de la lisozima sobre suspensiones de M. lysodeikticus.

o) Estudios sobre las posibilidades de transmisión de la capacidad inmunogénica, a través de extractos de RNA, obtenidas a partir de bazo de ratones previamente inmunizados con LPS de P. aeruginosa.

p) Experiencias sobre producción de interferón inespecífico, en presencia de LPS de P. aeruginosa y B. melitensis comparándola con la de un interferón viral, en presencia y ausencia de cromomicina y rifampicinas.

q) Ensayos previos "in vitro" sobre el efecto de LPS de P. aeruginosa en el crecimiento de algunas células tumorales.

Por todo ello, a la vista de los antecedentes consultados y los resultados por nosotros obtenidos, cabe sacar las siguientes conclusiones en relación con el conocimiento inmunobiológico de las moléculas endotóxicas procedentes de bacterias gramnegativas y de la respuesta inmunológica que condicionan en interacciones huesped-parásito:

1º De los tres métodos utilizados para la obtención de lipopolisacáridos endotóxicos la técnica de WESTPHAL y JANN resultó ser la más sencilla y la que proporcionó un mejor rendimiento. Las preparaciones así obtenidas deben someterse a un adecuado método de purificación para eliminar la gran contaminación por ácidos nucleicos. En los rendimientos obtenidos, con las seis especies estudiadas, se ha comprobado que la mayor riqueza en LPS correspondió al E. coli, seguido de S. typhi, P. aeruginosa, B. abortus, B. melitensis y Y. enterocolitica (en este orden).

2° De los distintos métodos de purificación utilizados por nosotros los mejores resultados se obtienen empleando la combinación de ultrafiltración y la cromatografía sobre gel de Sepharosa 2B precedido en algunos casos por el tratamiento con nucleasas. Así se obtienen preparaciones normalizadas que se pueden utilizar como antígenos estandar .

3° En cuanto a la posibilidad de obtención de endotoxinas marcadas con isótopos recomendamos el empleo de ^{51}Cr -cromato sódico, ya que obtuvimos preparaciones estables con una buena actividad específica y sin pérdida de actividad biológica. El marcaje con ^3H -glucosamina "in vivo" no nos dió tan buenos resultados. En cualquier caso, para estudios de interacción con ^{51}Cr -endotoxina recomendamos aplicar métodos inmunológicos para aumentar la especificidad de los resultados.

4° Se fijan las características espectroscópicas de los lipopolisacáridos endotóxicos para la zona del U.V., con ausencia de hombro a 260 nm indicador de contaminación por nucléicos.

5° Mediante espectroscopía IR se señalan las bandas mas significativas de las moléculas de LPS y se aprecian algunas diferencias existentes según el origen bacteriano de acuerdo con las variaciones en su composición y grado de purificación.

6° Se adapta el método espectrocolorimétrico de JANDA y WORK para estimaciones cuantitativas de los LPS en solución, estudiando las características y variabilidad de los espectros para las zonas comprendidas entre 472-510 y 600-650 nm, respectivamente, con endotoxinas de P. aeruginosa, E. coli y B. melitensis. Esta técnica permite determinar -según la absorción a 472 nm-concentraciones comprendidas entre 5 y 30 µg/ml de LPS.

7° Ensayos previos por RMN, muestran señales que se refieren posiblemente a los grupos $-CH_2$ y metilos de la porción lipídica, pero para estos estudios se requiere un equipo más sensible y conocer previamente las características de los monómeros y oligómeros obtenidos por detergentes. Nuestros resultados requieren posteriores ensayos.

8° Por cromatografía en gel y ultrafiltración hemos conseguido datos que indican un peso molecular superior a los 5×10^6 d para los LPS de P. aeruginosa, S. typhi, y B. melitensis, existiendo una mayor heterogeneidad para el primero de ellos. Los coeficientes de sedimentación para el LPS de B. melitensis y P. aeruginosa ($s_{20,w}^\circ$) son de 60 S y 19S respectivamente. Pudieran tener las subunidades pesos moleculares parecidos existiendo entre ellos diferencias en el nivel de agregación.

9° Al microscopio electrónico, los LPS de P. aeruginosa y B. melitensis -en tinción positiva- aparecen como estructuras acintadas o filamentosas (con algunas ramificaciones) unas largas y otras muy cortas. La proporción de las formas cortas, casi globulares, fué mayor en el caso de P. aeruginosa.

10° El tamaño medio de estas estructuras acintadas fue de unos 830 (± 80) Å por 90 (± 20) Å, mientras que los globulares presentaron un diámetro aproximado de 110 (± 20) Å. Ocasionalmente en los filamentos se observó una zona delimitada por dos líneas externas paralelas, densas, de unos 70 Å de anchura. Las diversas unidades del LPS parecen agruparse en estructuras bilaminares, según se observa al microscopio electrónico.

11° Los valores de DL_{50} encontrados -por vía i.p.- para las distintas endotoxinas estudiadas fué muy similar en todos los casos, oscilando desde 300 µg/ratón (E. coli Y. enterocolitica) hasta 410 µg/ratón (P. aeruginosa).

12° Las endotoxinas de P. aeruginosa, B. abortus y E. coli presentaron dosis pirogénicas activas -en el ensayo con amebocitos de Límulus- equivalentes a 0,05 µg/ml; mientras que en conejos, por inyección intravenosa, las endotoxinas de P. aeruginosa originaron aumentos de temperatura de 2,2°C (Pr-LPS) y 1,6°C (LPS), que son equivalentes

tes a un índice pirogénico (FI40) aproximadamente 0,3 mg.

13° No hemos detectado capacidad hipersensibilizante, en ratón, con el LPS de P. aeruginosa, posiblemente por no haber producido una infección subletal efectiva.

14° Sobre cultivo de células de bazo, aisladas de ratón, hemos comprobado que LPS procedentes de P. aeruginosa y de B. melitensis tienen una clara actividad mitogénica, con dosis activas de 10 µg/ml en el primer caso y de 100 µg/ml en el segundo, que se manifiestan al máximo a las 48 h. de contacto y se ejerce preferentemente sobre los linfocitos B.

15° La endotoxina de P. aeruginosa se ha demostrado como un buen inmunógeno para ratón y conejo. En la respuesta humoral primaria (en ratón) frente a una dosis inmunizante de 30 µg/animal se detectaron dos máximos de anticuerpos; uno hacia el séptimo día (IgM de 19S) y otro alrededor del doceavo día. Con la inmunización de conejos, sin embargo, obtuvimos únicamente anticuerpos de 19 S. Dosis superiores del LPS pueden producir ausencia o disminución de la respuesta inmunitaria, según comprobamos con concentraciones de 50 µg/ratón. Esta diferencia de comportamiento se analiza en la discusión de resultados.

16° Se ha comprobado que al tratamiento previo con anti-inflamatorios de síntesis del tipo indometacínico disminuye la inmuno-respuesta primaria anti-LPS.

17° Esta inmuno-respuesta primaria anti-LPS de P. aeruginosa, en raton, pudo ser transmitida a ratones normales mediante inyección intraperitoneal de RNA crudo procedente de bazos de ratones previamente inmunizados; la respuesta fué muy similar a la obtenida frente al antígeno, aunque aparecía adelantada en un día y con un nivel de anticuerpos ligeramente menor. En nuestra opinión, sin embargo, la única forma de dilucidar claramente las incertidumbres que existen a las respuestas inmunológicas frente a LPS es acudir a estudios utilizando sistemas de respuesta bien caracterizada tanto "in vivo" como "in vitro"

18° Asimismo hemos comprobado que, en determinadas condiciones, la endotoxina de P. aeruginosa puede actuar como inmunosupresora de anticuerpos humorales frente a lisozima en conejo, según hemos determinado en un sistema inmunológico enzima-anti-enzima.

19° Por otra parte, estudiando la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales de ratón, se demuestra que las endotoxinas de E. coli, P. aeruginosa y B. abortus producen un efecto inmunodepresor sobre la inmunidad celular y siendo las mas activas las dos primeras utilizadas. Este efecto es algo menos acentuado cuando se

estudia sobre ratones previamente vacunados.

29° También se ha comprobado que los LPS de P. aeruginosa y B. melitensis, por vía intravenosa, en pollos, son capaces de inducir en 4 a 6 horas la formación de un interferon inespecífico mediante dosis tan pequeñas como 0,1 µg. En niveles obtenidos representan un 50% del que se consigue con el virus de ensayo NDV y es algo superior en el caso del P. aeruginosa. Este interferon inducido por endotoxina, al igual que el inducido por NDV, es inhibido por tratamientos con moléculas rifamicínicas.

30° Y finalmente en presencia de LPS de P. aeruginosa, E. coli, B. melitensis y S. typhi -aun a dosis bastante elevadas- no se han encontrado actividades anti-tumorales "in vitro",apreciables frente al crecimiento del mastocitoma P815 de ratón DBA/2. Este estudio requiere ulterior confirmación mediante experiencias "in vivo"

BIBLIOGRAFIA

- 1- AARONSON, S.A., HARTLEY, J.W. y TODARO, G.J. (1969) Mouse leukemia virus: "Spontaneus" release by mouse embryo cells after longterm in vitro cultivation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 87-94
- 2- AARONSON, S.A. y STEPHENSON, J.R. (1974) Widespread natural occurrence of high titers of neutralizing antibodies to a specific class of endogenous mouse type C virus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1957-1961
- 3- AARONSON, S.A., TODARO, G.J. y SCOLNICK, E.M. (1971) Induction of murine C-type viruses from clonal lines of virus-free Balb/3T3 cells. Science 174, 157-159
- 4- ABERNATHY, R.S., BRADLEY, G.M. y SPINK, W.W. (1958). Increased susceptibility of mice with brucellosis to bacterial endotoxin. J. Immunol. 81 : 271-275.
- 5- ADAMS, G.A. (1972) Lipopolysaccharides. Preparation from Gram-negative bacteria. Methods in carbohydrate chem VII, 157-162.
- 6- ADAMS, G.A., KATES, M., SHAWO, D.H. y YAGUCHI, M. (1968) Studies on the chemical constitution of cell-wall lipopolysaccharides from *Neisseria perflava*. Can. J. Biochem. 46, 1175-1184
- 7- ADAMS, G.A., QUADLING, C. y PERRY, M.B. (1967) D-glycero-D-manno-heptose a component of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. Can. J. Microbiol. 13, 1605-1613
- 8- AL-ASKARI, S., ZWEIMAN, B., LAWRENCE, H.S. y THOMAS, L. (1964) The effect of endotoxin on skin homografts in rabbits. J. Immunol. 93, 742-748
- 9- ALAUPOVIC, P., OLSON, A.C. y TSANG, J. (1966) Studies on the characterization of lipopolysaccharides from two strains of *Serratia marcescens*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 133, 546-565

- 10- ALEXANDER, P. y EVANS, R. (1971) Endotoxin and double stranded RNA render macrophage cytotoxic. *Nature N. Biol.* 232, 76-78
- 11- ALLISON, A.C. y DAVIES, A.J.S. (1971) Requirement of thymus independent lymphocytes for potentiation by adjuvants and antibody formation. *Nature* 233, 330-332
- 12- ALLISON, A.C., DAVIES, P. y PAGE, R.C. (1973) Effects of endotoxin on macrophages and other lymphoreticular cells. *J. Infect. Dis.* 128 S, S212-S219
- 13- ANDERSSON, J. y MELCHERS, F. (1974) Maturation of mitogen-activated bone marrow derived lymphocytes in the absence of proliferation. *Eur. J. Immunol.* 4, 533-539.
- 14- ANDERSSON, J., MELCHERS, F., GALANOS, C. y LÜDERITZ, O. (1973) The mitogenic effect of lipopolysaccharide on bone marrow derived mouse lymphocytes. Lipid A as the mitogenic part of the molecule. *J. exp. Med.* 137, 943-953
- 15- ANDERSSON, J., MÖLLER, G. y SJOBERG, O. (1972c) Selective induction of DNA synthesis in T and B lymphocytes. *Cell. Immunol.* 4, 381-393
- 16- ANDERSSON, J., SJÖBERG, O. y MÖLLER, G. (1972 a) Mitogens as probes for immunocyte activation and cellular cooperation. *Transp. Rev.* 11, 131
- 17- ANDERSSON, J., SJÖBERG, O. y MÖLLER, G. (1972 b) Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides. *Eur. J. Immunol.* 2, 349-353
- 18- ARMERDING, D. y KATZ, D.H. (1974) Activation of T and B lymphocytes in vitro. I. Regulation influence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on specific T-cell helper function. *J. exp. Med.* 139, 24-43

- 19- ARMSTRONG, I.L. y REDMOND, J.W. (1974) The fatty acids present in the lipopolysaccharide of vibrio cholerae 569 B (INABA). Biochim. Biophys. Acta 348, 302-305
- 20- ARROYAVE, C.M., VALLOTA, E.H., MULLER-EBERHARD, H.J. (1974) Lysis of human erythrocytes due to activation of the alternate complement pathway by nephritic factor (C3NeF). J. Immunol. 113, 764-768
- 21- ASKONAS, B.A., SCHIMPL, A., WECKER, E. (1974) The differentiation function of T-cell replacing factor in nu/nu spleen cell cultures. Eur. J. Immunol. 4, 164-169
- 22- ATHENS, J.W., HAAB, O.P., RAAB, S.O., MAUER, A.M., ASHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G.E., WINTROBE, M.M. (1961). Leukokinetic studies. IV. The total blood circulating, and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. J. Clin. Invest. 40, 989-995
- 23- ATKINS, E. (1960) Pathogenesis of fever. Physiol. Rev. 40, 580-646
- 24- ATKINS, E. y FRANCIS, L. (1973) Role of lymphocytes in the pyrogenic response: comparison of endotoxin with specific antigen and the nonspecific mitogen, concanavalin A. J. infect Dis. 128 S, S277-S283
- 25- ATKINS, E. y SNELL, E.S. (1965) Fever. En: The inflammatory process. Academic Press, New York.
- 26- BACA, O.G. y PARETSKY, D. (1974) partial chemical characterization of a toxic lipopolysaccharide from Coxiella burnetii. Infect. Immunity 9, 959-961
- 27- BAENZINGER, N.L., BRODIE, G.N. y MAJERUS, P.W. (1971) A Thrombin-sensitive Protein of human platelet membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 240-243
- 28- BAKER, E.E., GOEBEL, W.F. y PERLMAN, E. (1949) The specific antigens of variants of Shigella sonnei. J. Exp. Med. 89, 325-338

- 29- BAKER, P.J., STASHAK, P.W., AMSBAUGH, D.F., PRESCOTT, B. y BARTH, R.F. (1970) Evidence for the existence of two functionally distinct types of cells which regulate the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide. *J. Immunol.* 105, 1581-1583
- 30- BAKER, P.J., WILSON, J.B. (1965) Hypoferremia in mice and its application to the bioassay of endotoxin. *J. Bacteriol.* 90, 903-910
- 31- BARA, J., LALLIER, R., BRAILOUSKY, C. y NIGAM, V.N. (1973) Fixation of a Salmonella minnesota R form glycolipid on the membrane of normal and transformed rat-embryo fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 35, 489-494
- 32- BARNES, F.W., LUPER, H. y HENRY, S.S. (1952). *Yale J. Biol. Med.* 24, 384-400 Ref. TOMASULO y cols (1975).
- 33- BARTH, R.F., SINGLA, B. y AHLERS, P. (1973) Effects of anti-lymphocyte serum on thymic independent immunity. I. Lack of immunosuppressive action on the antibody response to E. coli lipopolysaccharide. *Cell. Immunol.* 7, 380-388
- 34- BARTHOLD, D.R., PRESCOTT, B., STASHAK, P.W., AMSBAUGH, D.F. y BAKER, P.J. (1974) Regulation of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide. III. Role of regulatory T cells in the development of an IgG and IgA antibody response *J. Immunol.* 112, 1042-1050
- 35- BAYER, M.E. (1968) Areas of adhesion; adsorption of bacteriophages to adhesions between wall and membrane of Escherichia coli. *J. Virol.* 2, 346-356
- 36- BAYER, M.E. y REMSEN, C.C. (1970) Structure of E. coli after freezeetching. *J. Bacteriol.* 101, 304-313
- 37- BECKER, E.L. (1972) The relationship of the chemotactic behavior of the complement derived factors, C_{3a}, C_{5a} and C₅₆₇ and a bacterial chemotactic factor to their ability to activate the proesterase of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 135, 376-387
- 38- BEER, H., BRAUDE, A.I., y BRINTON, C.C.Jr. (1966) A study of particle sizes, shapes, and toxicities present in a Boivin-type endotoxic preparation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 133, 450-475

- 39- BEER, H., STAEHELIN, T., DOUGLAS, H. y BRAUDE, A. (1965) Relationship between particle size and biological activity of *E. coli* Boivin endotoxin. *J. Clin. Invest.* 44, 592-602
- 40- BEESON, P.B. (1947) Tolerance to bacteria pyrogens. II. Role of the reticulo-endothelial system. *J. Exp. Med.* 86, 39-44
- 41- BELL, R.M. MAVIS, R.D., OSBORN, M.J. y VAGELOS, P.R. (1971). Enzymes of phospholipid metabolism: localization in the cytoplasmic and outer membrane of the cell envelope of *E. coli* and *S. typhimurium*. *Biochim. Biophys. Acta* 249, 628-635
- 42- BENNET, I.L, PETERSOORF, R.G. y KEENE, W.R. (1957). Pathogenesis of fever: evidence for direct cerebral action of bacterial endotoxins. *Trans. Ass. Am. Phys.* 70, 64-73
- 43- BERGER, F.M. y FUKUI, G.M. (1963) Endotoxin induced resistance to infections and tolerance. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 114, 780-783
- 44- BERGER, F.M., FUKUI, G.M., LUDWIG, B.J. ROSSELET, J.P. (1969) Increased host resistance infection elicited by lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131, 1376-1381
- 45- BERRY, L.J. (1971) Metabolic Effects of bacterial endotoxins. *En: Microbial toxins*, edited by S. Kadis, G. Bainbaum y S.J. Ajl. New York. Academic vol. V, p. 165-208
- 46- BERRY, L.J. y RIPPE, D.F. (1973). Effect of endotoxin on induced liver enzymes. *The J. Infect. Dis.* 128 S, S118-S121
- 47- BISHOP, D.G., HEWETT, M.J., KNOX, K.W. (1971) Occurrence of 3-hydroxytridecanoic and 3-hydroxypentadecanoic acids in the lipopolysaccharides of *Veillonella*. *Biochim. Biophys. Acta.* 231, 274-276
- 48- BITENSKY, M.W., GORMAN, R.F., y THOMAS, L. (1971) Selective stimulation of epinephrine-responsive adenyl cyclase in mice by endotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138, 773-775

- 49- BJORNDAL, H., HELLERQVIST, C.G., LINDBERG, B. y SVENSSON, S. (1970a) *Angew Chem.* 82, 643 Ref. LUDERITZ, O, WESTPHAL, D, STAUB, A.M., y NIKAIDO, H. (1971) *Microbial Toxins IV*, Academic Press.
- 50- BJORNDAL, H., LINDBERG, B., y NIMMICH, W. (1970 b) Structural studies on the lipopolysaccharide from *Klebsiella*. *Acta Chem. Scand.* 24, 3414-3415.
- 51- BLADEN, H.A., GEWURZ, H. y MERGENHAGEN, S.E. (1967) Interactions of the complement system with the surface and endotoxic lipopolysaccharide of *veillonella alcalescens*. *J. Expt. Med.* 125, 767-786
- 52- BLANKWATER, M.J., LEVERT, L.A. y HIJMANS, W. (1975). Age-related decline in the antibody response to *E. coli* lipopolysaccharide in New Zeland Black mice. *Immunology* 28, 847-854
- 53- BLUESTEIN, H.G., GREEN, J. y BENACERRAF, B. (1970). The Inability of RNA from lymph node cells from immunized strain 2 animals to confer immune competence to strain 13 lymph node cells in the DNP-PLL Immune system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 135, 146.- 148
- 54- BOGGS, D.R., MARSH, J.C., CHERVENICK, P.A., CARTWRIGHT, G.E. y WITROBE, M.M. (1968) Neutrophil releasing activity in plasma of normal human subjects injected with endotoxin. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 127, 689-693
- 55- BOIVIN, A., MESROBEANU, I., y MESROBEANU, L. (1933). Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil* 113, 490-492
- 56- BOIVIN, A. y MESROBEANU, L. (1935) Recherches sur les antigenes somatiques et sur les endotoxines des bacteries. I. Considerations générales et expose des techniques utilisées. *Rev. Immunol.* 1, 553-569
- 57- BOMAN, H.G. y MONNER, D.A. (1975) Characterization of lipopolysaccharides from *E. coli* K-12 mutants. *J. Bacteriol.* 121, 455-464

- 58- BONA, C., DAMAIS, C., DIMITRIV, A., CHEDID, L. CIORBARU, R., ADAM, A., PETIT, J.F. y LEDERER, E. y ROSSELET, J.P. (1974) Mitogenic effect of a water-soluble extract of *Nocardia opaca*: a comparative study with some bacterial adjuvants on spleen and peripheral lymphocytes of four mammalian species. *J. Immunol.* 112, 2028-2035
- 59- BOURNE, H.R., LICHTENSTEIN, L.M., MELMON, K.L. HENNEY, C.S. WEINSTEIN, Y. y SHEARER, G.M. (1974). Modulation of the Inflammation and Immunity by cyclic AMP. *Science* 184, 19-28.
- 60- BOWSER, D.V., WHEAT, R.W., FOSTER, J.W. y LEONG, D. (1974) Occurrence of quinovosamine in lipopolysaccharides of *Brucella* species. *Infect. Immunity* 9, 772-774
- 61- BRADLEY, S.G. y WATSON, D.W. (1964) Suppression by endotoxin of the immune response to actinophage in the mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117, 570-572
- 62- BRAUDE, A.I., CAREY, F.J., SUTHERLAND, D. y ZALESKI, M. (1955) Studies with radioactive endotoxin. I. The use of Cr^{51} to label endotoxin of *E. coli*. *J. Clin. Invest.* 34, 850-857
- 63- BRAUDE, A.I., DOUGLAS, H. (1972) Passive immunization against the local shwartzman reaction. *J. Immunol.* 108, 505-512
- 64- BRAUDE, A.I., DOUGLAS, H. y DAVIS, C.E. (1973) Treatment and prevention of intravascular coagulation with antiserum to endotoxin. *J. Infect. Dis.* 128S, S157-S163.
- 65- BRAUN, V. y BOSCH, V. (1972) Repetitive sequences in the murein-lipoprotein of the cell wall of *E. coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 970-974
- 66- BRAUN, W. (1973) Immunologic and antineoplastic effects of endotoxin: Role of membranes and mediation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Infect. dis.* 128, S188-S197

- 67- BRAY, D. y ROBBINS, P.W. (1967) The direction of chain growth in Salmonella anatum O-antigen biosynthesis. Biochem. Biophys Res. Commun. 28, 334-339
- 68- BRODEUR, B.R. y MERIGAN, T.C. (1974) Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep blood cells in mice. J. Immunol. 113, 1319-1325
- 69- BRODEUR, B.R. y MERIGAN, T.C. (1975) Mechanism of the suppressive effect of interferon on antibody synthesis in vivo. J. Immunol. 114, 1323-1328
- 70- BRUNETEAU, M., VOLK, W.A., SINGH, P.P. y LÜDERITZ, O. (1974) Structural investigations on the Samonella T2 lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 43, 501-508
- 71- BRUNSON, K.W. y WATSON, D.W. (1975) Concanavalin A preparations with activities related to Bacterial lipopolysaccharide. J. Immunol. 115, 599-600
- 72- BUCKMIRE, F.L.A. y MURRAY, R.G.E. (1970) Studies on the cell wall of Spirillum serpens. I. Isolation and partial purification of the outermost cell wall layer. Can. J. Microbiol. 16, 1011-1022
- 73- BUCKMIRE, F.L.A. (1971) A protective role for a cell wall protein layer of spirillum serpens against infection by Bdellovibrio bacteriovorus. Bacteriol. Proc. p. 43
- 74- BUCKMIRE, F.L.A. y MURRAY, R.G.E. (1973) Studies on the cell wall of Spirillum serpens. II. Chemical characterization of the outer structured layer. Can. J. Microbiol. 19, 59-66
- 75- BUNN, C.R., McNEILL, J.J. y ELKAN, G.H. (1970) Effect of biotin on fatty acids and phospholipids of biotin-sensitive strains of Rhizobium japonicum. J. Bacteriol. 102, 24-29
- 76- BURGE, R.E. y DRAPER, J. C. (1967) The structure of the cell wall of the Gram-negative bacterium Proteus vulgaris. III. A lipopolysaccharide "unit membrane". J. Mol. Biol. 28, 205-210
-

- 77- BURROWS, T.W. y BACON, G.A. (1956) The basis of virulence in Pasteurella pestis, the development of resistance to phagocytosis "in vitro". Brit. J. exp. Pathol. 37, 286-299
- 78- BURTON, A.J. y CARTER, H.E. (1964) Purification and characterization of the lipid A component of the lipopolysaccharides from E. coli. Biochemistry 3, 411-418
- 79- CAPALDI, R.A. y VANDERKOOI, G. (1972) The low polarity of many membrane properties. Proc. Nat. Acad. Sci. US 69, 930-932
- 80- CARTER, W.A. (1970) Interferon: evidence for subunit structure Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 620-628
- 81- CENTANNI, E. (1894) Zur lehre von der putriden oder septischen infektion. Chem. Zbl. 6, 597
- 82- CHEDID, L. (1973) Possible role of endotoxemia during immunologic imbalance. J. Infect. dis. 128S, S112-S117.
- 83- CHENG, K.J. y COSTERTON, J.W. (1973) Localization of alkaline phosphatase in three Gram-negative rumen bacteria. J. Bacteriol. 116, 424-446
- 84- CHENG, K.J., INGRAM, J.M., COSTERTON, J.W. (1971) Interactions of alkaline phosphatase and the cell wall of Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 107, 325-336
- 85- CHERMANN, J.C., DIGEON, M., KOUZNETZOVA, B., RAYNAUD, M. (1971) Smooth and rough heavy endotoxins and lipopolysaccharides: preparation and properties. En "International symposium on enterobacterial vaccines. Bern. 1969 (Symp. series Immunobiol. Standard v. 15) Karger, Basel, p. 123-130
- 86- CHERMANN, J.C., DIGEON, M. RAYNAUD, M. (1967) Une nouvelle méthode de purification des endotoxines; la précipitation par le polyéthylène-glycol. C.R. Acad. Sci. (Paris) 265, 1251-1252
- 87- CHERVENICK, P.A. (1972) Effect of endotoxin and postendotoxin plasma on in vitro granulopoieses J. Lab. Clin. Med. 79, 1014-1020

- 88- CHERVENICK, P.A., BOGGS, D.R., MARSH, J.C., CARTWRIGHT, G.E. y WINTROBE, M.M. (1967) The blood and bone marrow neutrophil response to graded doses of endotoxin in mice. Proc. Soc. exp. Biol. (NY) 126, 891-895
- 89- CHERVENICK, P.A. y LOBUGLIO, A.F. (1972) Human blood monocytes: Stimulation of granulocyte and mononuclear colony formation in vitro. Science 178, 164-166
- 90- CHERVENKA, C.H. (1969) A manual of methods for the analytical ultracentrifuge. Spinco Division of Beckman Instruments. Inc. Palo Alto, California.
- 91- CHILLER, J.M., SKIDMORE, B.J., MORRISON, D.C. y WEIGLE, W.O. (1973) Relationship of the structure of Bacterial lipopolysaccharides to its function in mitogenesis and adjuvancy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2129-2133
- 92- CHILLER, J.M. y WEIGLE, W.O. (1973) Termination of tolerance to human gamma globulin in mice by antigen and bacterial lipopolysaccharide (endotoxin). J. exp. Med. 137, 740-750
- 93- CHIPLEY, J.R. (1974) Release of lipopolysaccharide, phospholipids and enzymes from Salmonella enteritidis by ethylenediamine tetraacetic acid. Microbios 10, 139-150
- 94- CLAUS, D. (1965) 2-keto-3-deoxygalactonic acid as a constituent of an extracellular polysaccharide of Azotobacter vinelandii. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 745-751
- 95- CLINE, M.J., MELMON, K.L., DAVIS, W.C. y WILLIAMS, H.E. (1968) Mechanism of endotoxin interaction with human leucocytes. Br. J. Haematol. 15, 539
- 96- CLINE, M.J., ROTHMAN, B. y GOLDE, D.W. (1975) Effect of endotoxin on the production of colony-stimulating factor by human monocytes and macrophages. J. Cell. Physiol. 84, 193-196
- 97- CLUFF, L.E. (1970) Effects of endotoxin on susceptibility to infections. J. Infect. Dis. 122, 205-215
- 98- COOPER, K.E., CRANSTON, W.I. y HONOUR, A.J. (1967) Observations on the site and mode of action of pyrogens in the rabbit brain. J. Physiol. (London) 191, 325-337

- 99- COOPER, J.F., LEVIN, J. y WAGNER, Jr. II, N (1971) J. Lab. Clin. Med. 78 , 138-148. Ref. TOMASULO y cols (1975).
- 100- CORNELL, R.P. y FILKINS, J.P. (1974) Characterization of gluconeogenesis in enzymatically isolated parenchymal cells of rat liver. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145, 203-209
- 101- CORRIGAN, J.J.Jr., SIEBER, O.F.Jr., RATAJCZAK, H. y BENNET, B.B. (1974) Modification of human neutrophil response to endotoxin with polymyxin B sulfate. J. Infect. dis 130, 384-387
- 102- COSTERTON, J.W. (1970) The structure and function of the cell envelope of Gram-negative bacteria. Rev. Can. Biol. 29, 299-316
- 103- COUTINHO, A., GRONOWICZ, E., BULLOCK, W.W. y MÖLLER, G.J. (1974) Mechanism of thymus-independent immunocyte triggering Mitogenic activation of B. cells results in specific immune responses. J. Exp. Med. 139, 74-92
- 104- COUTINHO, A., GRONOWICZ, E. y SULTZER, B.M. (1975) Genetic control of B-cell responses, I selective unresponsiveness to lipopolysaccharide. Scand. J. Immunol. 4, 139
- 105- COUTINHO, A. y MÖLLER, G. (1973) B cell mitogenic properties of thymus independent antigens. Nature (New Biol). 245, 12
- 106- COUTINHO, A. y MÖLLER, G. (1975) Thymus-independent B cell induction and paralysis. Adv. in immunol. 21, 113-236
- 107- CYNKIN, M.A. y OSBORN, M.J. (1968) Proc. Soc. Exp. Biol. 27, 293. Ref. OSBORN (1969).
- 108- DALE, D.C., WOLFF, S.M. (1973) Studies of the neutropenia of acute malaria. Blood, 41, 197-206.

- 109- DANIELLI, J.F. y DAVSON, P. (1935)
A contribution to the theory of permeability of thin films
J. cell. comp. Physiol. 5, 495-508.
- 110- DANKERT, M., WRIGHT, A., KELLEY, W.S. y ROBBINS, P.W. (1966)
Isolation, purification and properties of the lipid linked
intermediates of O-antigen Biosynthesis. Arch . Biochem. Biophys
116, 425-435.
- 111- DAVIES, D.A.L. (1960) Polysaccharides of gram-negative bacteria.
Adv. Carbohydrate Chem. 15, 271-340
- 112- DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N., GINSBERG, H.S. y WOOD,
W.B., Jr. (1967) "Microbiology". Harper, New York
- 113- DeCLERCQ, E., MERIGAN, T.C. (1970) Stimulation on inhibition of
interferon production depending on time of cycloheximide admin-
istration. Virology 42, 799-802
- 114- DENEKE, C.F., y COLWELL, R.R. (1973) Lipopolysaccharide and
proteins of the cell envelope of *Vibrio marinus*, a marine bac-
terium. Can. J. Microbiol. 19, 1211-1217
- 115- DePAMPHILIS, M.C. y ADLER, J. (1971) Attachment of flagellar
basal bodies to the cell envelope: specific attachment of the
outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane.
J. Bacteriol. 105, 396-407
- 116- DePETRIS, S. (1967) Ultrastructure of the cell wall of *E. coli*
and the chemical nature of its component layers. J. ultrastruct.
Res. 19, 45-83
- 117- DeSOMER, P., DeCLERCQ, E. ; COCITO, E. y BILLIAU, A. (1970)
The interferon inducer from *Brucella*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 173
274-281
- 118- DesPREZ, R.M., HOROWITZ, H.I., HOOK, E.W. (1961) Effects of
bacterial endotoxin on rabbit platelets. I Platelet aggregation
and release of platelet factors in vitro. J. exp. Med. 114,
857-874
- 119- DeVOE, I.W., COSTERTON, J.W. y MacLEOD, R.A. (1971) Demonstra-
tion by freeze-etching of a single cleavage plane in the cell
wall of a gram-negative bacterium. J. Bacteriol. 106, 659-671

- 120- DIAMANTSTEIN, T., VOGT, W., RUHL, H. y BOCHERT, G. (1973) Stimulation of DNA synthesis in mouse lymphoid cells by polyanions in vitro. I Target cells and possible mode of action. Eur. J. Immunol. 3, 488-493
- 121- DIAMANTSTEIN, T., BLITSTEIN-WILLINGER, E., SCHULZ, G. (1974) Polyanions and lipopolysaccharide acts on different subpopulations of B cells. Nature 250, 596-597
- 122- DIAZ, R., LACALLE, R., MEDRANO, M.P. y LEONG, D. (1970). Immunobiological activities of the endotoxin from Yersinia enterocolitica strain M.Y. 79. Proc. Vth International Congress of Infections diseases, 2, 11-17.
- 123- DMITRIEV, B.A., BAKINOWSKY, L.V., LUOV, V.L., KOCHETKOV, N.K. y HOFMAN, I.L. (1975) Somatic antigen of Shigella dysenteriae type 3. Structural features of specific polysaccharide chain. Eur. J. Biochem. 50, 539-547
- 124- DOGGET, R.G. (1965) Enzymatic action on the capsular material produced by Ps. aeruginosa of cystic fibrosis origin. J. Bacteriol. 89, 476-480
- 125- DREHER, K.D., SCHULMAN, J.H., ANDERSON, O.R. y ROELS, D.A. (1967) The stability and structure of mixed lipid monolayers and bilayers. I. Properties of lipid and lipoprotein monolayers on OSO_4 solution and the role of cholesterol, retinol and tocopherol in stabilizing lecithin monolayers. J. Ultrastruct. Res. 19, 586-599
- 126- DRESSER, D.W. (1970) The immune response: circumvention and suppression. Proceed. Fourth Intern. Congr. Pharmacol. 4, 192
- 127- DRESSER, D.W. (1972) The role of T cells and adjuvant in the immune response of mice to foreign erythrocytes. Eur. J. Immunol. 2, 50
- 128- DRESSER, D.W. (1973) Immunopotential, p. 3. Ciba Foundation Symposium 18
- 129- DRESSER, D.W. y TAO, T.W. (1975) The immune response of mice to $\phi x174$: the potentiation of B cell immunity and the suppression of T cell help by pertussis vaccine. Immunol. 28, 443-450

- 130- DRESSER, D.W. y PHILLIPS, J.M. (1974) The orientation of the adjuvant activities of Salmonella typhosa lipopolysaccharide and lentinan. Immunology 27, 895-902
- 131- DREWRY, D.T., SYMES, K.C., GRAY, G.W. y WILKINSON, S.G. (1975) Studies of polysaccharide fractions from the lipopolysaccharide of P. aeruginosa. N.C.T.C. 1999. Biochem. J. 149, 93-106
- 132- DRÖGE, W., LEHMANN, V. y LÜDERITZ, O., y WESTPHAL, O. (1970) Structural investigations on the 2-keto-3-deoxyoctonate region of lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 14, 175-184
- 133- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K. REBERS, P.A. y SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356
- 134- DUBOS, R.J. y SCHEDLER, R.W. (1956) Reversible changes in the susceptibility of mice to bacterial infections. I. Changes brought about by injection of pertussis vaccine or of bacterial endotoxins. J. exp. Med. 104, 53-65
- 135- DUKOR, P., SCHUMANN, G., GISLER, R., DIERICH, M., KONIG, W., HADDING, V. y BITTER-SVERMANN, O. (1974) Complement dependent B cell activation by cobra venom factor and other mitogens. J. exp. Med. 139, 337-354
- 136- DUNN, T.B. y POTTER, M. (1957) J. Natl. Cancer Inst. 18, 587. Ref. HENNEY, C.S. y BUBBERS J.E. (1973) J. Immunol 110, 63-72.
- 137- DVORAK, H.F., WETZEL, B.K. y HEPPEL, L.A. (1970) Biochemical and cytochemical evidence for the polar concentration of periplasmic enzymes in a "minicell" strain of E.coli. J. Bacteriol. 104, 542-548
- 138- EAGON, R.G. (1974) Ultrastructure of the cell envelope of P. aeruginosa: electron microscopic and chemical observation. J. Infect. Dis. Suppl. 130, S 65- S 80
- 139- EDSTROM, R.D. (1969) A colorimetric method for the determination of mucopolysaccharides and other acidic polymers. Anal. Biochem. 29, 421-432

- 140- EDSTROM, R.D. y HEATH, E.C. (1965) Isolation of colitose-containing oligosaccharides from the cell wall lipopolysaccharide of E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 638-643
- 141- EDSTROM, R.D. y HEATH, E.C. (1967) The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in E. coli. J. Biol. Chem. 242, 4125-4133
- 142- ELIAS, H.G. (1964) Theory and application of ultracentrifugal techniques. Beckman Instruments GMBH, Munich, p 89
- 143- ELIN, R.J. y WOLFF, S.M. (1974) The role of iron in nospecific resistance to infection induced by endotoxin. J. Immunol. 112, 737-745
- 144- ELLIOT, L.P. y SNYDER, I.S. (1972) Effect of endotoxin on phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in mouse liver. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 141, 253-257
- 145- ELLWOOD, D.C. (1966) The distribution of 3-deoxy-2-oxo sugar acids in the cell walls of Gram-negative bacteria. Biochem. J. 99, 55p
- 146- ELLWOOD, D.C. (1968) Biochem. J. 106 47P, Ref. LUDERITZ, O, WESTPHAL, O, STAUB, A.M. y NIKALDO, H. (1971) Microbial toxins IV. Academic Press.
- 147- FARRAR, W.E. y WATSON, J.G. (1964) Hypoglycemia following endotoxin administration in animals with liver damage. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115, 833-837
- 148- FEINGOLD, D.S., GOLDMAN, J.M. y KURITZ, H.M. (1968) Locus of the lethal event in the serum bactericidal reaction. J. Bacteriol. 96, 2127-2131
- 149- FELDBERG, W. (1974) Fever, prostaglandins and antipyretics. En: Prostaglandin synthetase inhibitors, Editado por H.J. Robinson y J.R. Vane. Raven Press, New York.

- 150- FELDMANN, M. (1972). Cell interactions in the immune response in vitro. V. Specific collaboration via complexes of antigen and thymus-derived cell immunoglobulin. J. Exp. Med. 136, 737-760
- 151- FELDMANN, M. y BASTEN, A. (1971) The relationship between antigenic structure and the requirement for thymus-derived cells in the immune response. J. Exp. Med. 134, 103- 119
- 152- FELDMANN, M. y BASTEN, A. (1972) Cell interactions in the immune response in vitro. IV Comparison of the effects of antigen specific and allogeneic thymus-derived cell factors. J. Exp. Med. 136, 722-736
- 153- FELDMANN, M. , BASTEN, A., BOYLSTON, A., ERB, P., GORCZYNSKI, R., GREAVES, M., HOGG, N., KILBURN, D., KONTIAINEN, S. PARKER, D. y PEPYS, M. y SCHRADER, J. (1974) Interaction between T and B lymphocytes and accessory cells in antibody production p 65-75. En: BRENT and J. HOLBORROW (ed) Progress in immunol. II, vol. 3. North-Holland Amsterdam.
- 154- FELDMANN, M.y NOSSAL, G.V.J. (1973) Tolerance enhancement and the regulation of interactions between T cells, B, cells and macrophages. Transp. Rev.13, 3
- 155- FELDBERG, W. y SAXENA, P.N. (1975) Prostaglandin, endotoxin and lipid A on body temperature in rats. J. Physiol. 249, 601-615
- 156- FENSOM, A.H. y GRAY, G.W. (1969) The chemical composition of the lipopolysaccharide of P. aeruginosa. Biochem. J. 114, 185-196
- 157- FENSOM, A.H. y MEADOW, P.M. (1970) Evidence for two regions in the polysaccharide moiety of the lipopolysaccharide of P. aeruginosa 8602. FEBS Lett. 9, 81-84
- 158- FERREIRA, S.H. y VANE, J.R. (1974) New aspects of the mode of action of nonsteroid anti-inflammatory drugs. Ann. Rev. Pharmacol. 14, 57-73
- 159- FILKINS, J.P. (1972) Hepatic detoxification of endotoxin after adrenalectomy. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 140, 212-215

- 160- FILKINS, J.P. (1973) Hypoglycemia and depressed hepatic gluconeogenesis during endotoxemia in lead-sensitized rats. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 142, 915-918
- 161- FILKINS, J.P. y CORNELL, R.P. (1974) Depression of hepatic gluconeogenesis and the hypoglycemia of endotoxin shock. Amer. J. Physiol. 227, 778-781
- 162- FINE, D.P. (1974) Activation of the classic and alternate complement pathways by endotoxin. The. J. Immunol. 112, 763-769
- 163- FINE, D.P., MARNEY, S.R., Jr, COLLEY, D.G. y DesPREZ, R.M. (1973). En: Haemophilus influenzae, Edited by S. Sell, Vanderbilt Press., Nashville, Tenn.
- 164- FINE, D.P., MARNEY, S.R., Jr, COLLEY, D.G., SERGENT, J.S. y DesPREZ, R.M. (1972) C3 Shunt activation in human serum chelated with EGTA. J. Immunol. 109, 807-809
- 165- FINGER, H., FRESENIUS, H. y ANGERER, M. (1971) Bacterial endotoxins as immunosuppressive agents. Experientia 27, 456-458
- 166- FINK, M.E., CALABRESI, P. (1962) The granulocyte response to an endotoxin (pyrexal) as a measure of functional marrow reserve in cancer chemotherapy. Ann. Intern. Med. 57, 732-742
- 167- FINKELSTEIN, R.A. (1961) Alterations of susceptibility of embryonated eggs to Newcastle disease virus by E. coli and endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106, 481-484
- 168- FINKELSTEIN, M.S., BAUSEK, G.H., MERIGAN, T.C. (1968) Interferon inducers "in vitro": difference in sensitivity to inhibitors of RNA and protein synthesis. Science 161, 465-468
- 169- FLOERSHEIM, G.L. y SZESZAK, J.J. (1972) Poli I, poli C and endotoxins share immunosuppressive properties and increase the toxicity of alpha-amanitin and hexobarbital. Agents. Actions. 2, 150-155
- 170- FORBES, I. J. (1965) Induction of mitosis in macrophages by endotoxin. J. Immunol. 94, 37-39

- 171- FORBES, J.T., NAKAO, Y y SMITH, R.T. (1974) LPS stimulation of mouse thymus cells triggered by subthreshold T cell mitogens. Fed. Proc. 33, 734
- 172- FORGE, A, COSTERTON, J.W. y ANN KERR, K. (1973) Freeze-etching and x-ray diffraction of the isolated double-track layer from the cell wall of a gram-negative pseudomonad. J. Bacteriol. 113, 445-451
- 173- FORSBERG, C.W., COSTERTON, J.W. y MacLEOD, R.A. (1970 a) Separation and localization of the cell wall layers of a gram-negative bacterium. J. Bacteriol. 104, 1338-1353
- 174- FORSBERG, C.W., COSTERTON, J.W. y MacLEOD, R.A. (1970 b) Quantitation, chemical characterization and ultrastructure of the three outer cell wall layers of a gram-negative bacterium. J. Bacteriol. 104, 1354-1368
- 175- FOSTER, J.W. y RIBI, E. (1962) Immunological role of Brucella abortus cell walls. J. Bacteriol. 84, 258-268
- 176- FRANK, M.M., MAY, J., GAITHER, T. y ELLMAN, L. (1971) In vitro studies of complement function in sera of C4-deficient guinea pigs. J. Exp. Med. 134, 176-187
- 177- FRANK, M.M., MAY, J.E. y KANE, M.A. (1973) Contributions of the classical and alternate complement pathways to the biological effects of endotoxin. J. Infect. Dis. 128 S, S 176-S 181
- 178- FRANZL, R.E. y McMASTER, P.D. (1968) The primary immune response in mice. I. The enhancement and suppression of hemolysin production by a bacterial endotoxin. J. exp. med. 127, 1087-1107
- 179- FRIEDMAN, H. (1964) Antibody plaque formation by normal mouse spleen cultures exposed in vitro to RNA from immune mice Science 146, 934-936
- 180- FRIEDMAN, H. (1964). Prevention of immunologic unresponsiveness to Shigella antigens in neonatal mice by homologous spleen cells transplants. J. Immunol 92, 201-207.
- 181- FRIEDMAN, H. (1966). Immunologic tolerance to microbial antigens. II. Suppressed antibody plaque formation to Shigella antigen by spleen cells from tolerant mice. J. Bact. 92, 820-827.

- 182- FRIEDMAN, H. (1973). Cellular and molecular aspects of the immune response to a bacterial somatic antigen. J. Infect. Dis. S128, S61-S-69.
- 183- FRIEDMAN, H. y LANDY, M. (1971). Separate spleen cell populations synthesizing bacteriolytic versus agglutinating antibody in mice immunized with E.coli somatic antigen. Cell. Immunol. 2 , 153-163.
- 184- FRUHMANN, G. J. (1966) Bacterial endotoxin: Effects on erythropoiesis. Blood 27, 363-370
- 185- FULLER, N.A. y STAUB, A.M. (1968) Immunochemical studies on Salmonella. 13.chemical changes appearing on the specific polysaccharide of S. cholerae suis (6₂, 7) after its conversion by Phage 14 (6,7). Eur. J. Biochem. 4, 286-300
- 186- FULLER, N.A., WU, M.C. WILKINSON, R.G., y HEATH, E.C. (1973) The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in E. coli. The J. Biol. Chem. 248, 7938-7950
- 187- GALANOS, C., LÜDERITZ, O., y WESTPHAL, O. (1969) A new method for extraction of R lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 9, 245-249
- 188- GALANOS, C., y LÜDERITZ, O. (1975) Electrolysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms. Eur. J. Biochem. 54, 603-610
- 189- GALANOS, C., RIETSCHEL, E., YOSHIDA, M., LÜDERITZ, O., WESTPHAL, O., KIM, B.Y y WATSON. O.W. (1971) Biological activities of lipid A complexed to bovine serum albumin. Eur. J. Biochem. 31, 230-233
- 190- GANS, H. y KRIVIT, W. (1961) Effect of endotoxin on the clotting mechanism. II. On the variation in response in different species of animals. Ann. Surg. 153, 453-458
- 191- GARCIA, M.M., CHARLTON, K.M. y MCKAY, K.A. (1975) Characterization of endotoxin from Fusobacterium necrophorum. Infect. & Immunity 11, 371

- 192- GEMSA, D., WOO, C.H., FUDENBERG, H.H., SCHMID, R. (1974) Stimulation of heme oxygenase in macrophages and liver by endotoxin J. Clin. Invest. 53, 647-651
- 193- GERSHON, R.K. (1974) T cell control of antibody production p. 1-40. En. M.D. Cooper y N.L. Warner, (ed) Contemporary topics in immunobiology, vol. 3, Plenum. New York.
- 194- GERHSON, R.K., COHEN, P., HENCIN, R. y LIEBHABER, S. (1972) Suppressor T cells. J. Immunol. 108, 586-590
- 195- GERY, I., GERSHON, R.K. y WAKSMAN, B.W. (1972) Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. J. exp. Med. 136, 128-142
- 196- GERY, I., KRUGER, K. y SPIESEL, S.Z. (1972) Stimulation of B-lymphocytes by endotoxin. Reactions of thymus-deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing T₆T₆ Thymus grafts. J. Immunol. 108, 1088-1091
- 197- GERY, I., WAKSMAN, B.H. (1972) Potentiation of the T- lymphocyte response to mitogens. II. the cellular source of potentiating mediator(s). J. Exp. Med. 136, 143-155
- 198- GEWURZ H., SHIN, H.S. y MERGENHAGEN, S.E. (1968) Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide: consumption of the six terminal complement components. J. Exp. Med. 128, 1049-1057
- 199- GEY, G.O. y COFFMAN, W.O. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity epithelium. Cancer Res. 12, 264
- 200- GIELEN, W. (1968) Z. Naturforsch 23 b, 1958. Ref. LUDERITZ, o, WESTPHAZ, o STAUB, A.M. y NIKAIKO, H. (1971) Microbial toxins IV. Academic Press.
- 201- GIGLI, I., NELSON, R.A.Jr. (1968) Complement dependent immune phagocytosis. I. Requirements for C'1, C'4, C'2, C'3. Exp. Cell. Res. 51, 45-67
- 202- GILLELAND, H.E., Jr., STINNET, J.D., ROTH, I.L. y EAGON, R.G. (1973) Freeze-etch study of *P. aeruginosa*: localization within the cell wall of an ethylenediamine-tetraacetate-extractable component. J. Bacteriol. 113, 417-432

- 203- GISLER, R.H., LINDAHL, P. y GRESSER, I. (1974) Effect of interferon on antibody synthesis in vitro. J. Immunol. 113, 438-444
- 204- GLAUERT, A.M. y THORNLEY, M.J. (1969) The topography of the bacterial cell wall. Ann. Rev. Microbiol. 23, 159-198
- 205- GLEDHILL, A.W. (1959 a) The effect of Bacterial endotoxin on resistance of mice to ectromelia. Brit. J. Exp. Pathol, 40, 195-202
- 206- GLEDHILL, A.W. (1959 b) Sparing effect of serum from mice treated with endotoxin upon certain murine virus diseases. Nature 183, 185-186
- 207- GLEW, R.H. y HEATH, E.C. (1971) Studies on the extracellular alkaline phosphatase of *Micrococcus sodonensis*. II. Factors affecting secretion. J. Biol. Chem. 246, 1566-1574
- 208- GMEINER, J. (1975) The isolation of two different lipopolysaccharide fractions from various proteus mirabilis strains. Eur. J. Biochem. 58, 621-626
- 209- GMEINER, J., LÜDERITZ, O., WESTPHAL, O. (1969) Biochemical studies on lipopolysaccharides of Salmonella R mutants. 6. Investigations on the structure of the lipid A component. Eur. J. Biochem. 7, 370-379
- 210- GOEBEL, W.F. (1963) Colanic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. US. 49, 464-471
- 211- GOEBEL, W.F., BINKLEY, F., y PERLMAN, E. (1945) Studies on the flexner group of dysentery bacilli. I. The specific antigens of *Shigella paradysenteriae* (Flexner) J. Exptl. Med. 81, 315-330
- 212- GOLDBERG, N.D., HADDOX, M.K., DUNHAM, E., LOPEZ, C, HADDEN, J.W. (1974) Control of proliferation in animal cells, ed. B. Clarkson, R. Baserga, 609-625, New York. Cold. Spring Harbor Lab.
- 213- GOLDSTEIN, I.M., WUNSCHMANN, B., ASTRUP, T., HENDERSON, E.S. (1971) Effects of bacterial endotoxin on the fibrinolytic activity of normal human leukocytes. Blood 37, 447-453

- 214- GORMUS, B.J., CRANDALL, R.B. y SHANDS, J. W. Jr., (1974) Endotoxin-stimulated spleen cells: mitogenesis the occurrence of the C₃ receptor and the production of immunoglobulin. J. Immunol. 112, 770-775.
- 215- GORMUS, B.J. y SHANDS, Jr., J.W. (1975). Endotoxin-stimulated spleen cells: characterization of the responding cells. J. Immunol. 115, 118-123
- 216- GOTTLIEB, A. y SCHWARTZ, R.H. (1972). Antigen - RNA Interaction. Cellular Immunol. 5, 341-362.
- 217- GÖTZE, O. (1975) Cold Spring Harbor. Simp: Cell Proliferation, vol. II, In Press.
- 218- GÖTZE, O., MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1971) The C₃-activator system: an alternate pathway of complement activation. J. Exp. Med. 134 (suppl) 90 S - 108 S
- 219- GREER, G.G., EPPS, N.A. y VAIL, W.J. (1973) Interaction of lipopolysaccharides with mitochondria. II. Effects of magnesium ions on toxicity of a rough lipopolysaccharide. J. Infect. Dis. 128, 724-729
- 220- GREISMAN, S.E. y DuBUY, B. (1975) Mechanisms of endotoxin tolerance IX. Effect of exchange transfusion. Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 148, 675-678
- 221- GREISMAN, S.E., HORNICK, R.B. (1969) Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 1154-1158
- 222- GREISMAN, S.E. y HORNICK, R.B. (1973) Mechanisms of endotoxin tolerance with special reference to man. J. Infect. Dis. 128, S 265-276
- 223- GREISMAN, S.E., HORNICK, R.B., WOODWARD, T.E. (1964) The role of endotoxin during typhoid fever and Tularemia in man. III. Hyperreactivity to endotoxin during infection. J. clin. Invest. 43, 1747-1757
- 224- GREISMAN, S.E., YOUNG, E.J. CAROZZA, F.A. Jr. (1969) Mechanisms of endotoxin tolerance. V Specificity of the early and late phases of pyrogenic tolerance. J. Immunol. 103, 1223-1236

- 225- GREISMAN, S.E., YOUNG, E.J., WORKMAN, J.B., OLLODART, R.M., HORNICK, R.B. (1975). Mechanisms of endotoxin tolerance. The role of the spleen. J. Clin. Invest. 56, 1597-1607
- 226- GREISMAN, S.E., WAGNER, H.N.Jr., IIO, M., HORNICK, R.B. (1964 a) Mechanisms of endotoxin tolerance II. Relationship between endotoxin tolerance and reticuloendothelial system phagocytic activity in man. J. exp. Med. 119, 249-264
- 227- GROHSMAN, J. y NOWOTNY, A. (1972) The immune recognition of TA3 tumors, its facilitation by endotoxin and abrogation by ascites fluid. J. Immunol. 109, 1090-1095
- 228- GROLLMAN, A.P. y OSBORN, M.J. (1964) O-Phosphorylethanolamine: A component of lipopolysaccharide of certain gram-negative bacteria. Biochemistry 3, 1571-1574
- 229- GRONOWICZ, E. y COUTINHO, A. (1974) Selective triggering of B cell subpopulations by mitogens. Eur. J. Immunol. 4, 771-776
- 230- GROSS, L. (1966) Nat. Cancer Inst. Mongr. 22, 407. Ref. MORONI y SCHUMANN (1975b)
- 231- GUHATHAKURTA, B., y DUTTA, G.C. (1974) Immunochemical studies on lipopolysaccharide from agglutinable and non-agglutinable vibrios. Appl. Microbiol. 27, 634-639
- 232- HADDEN, J.W., HADDEN, E.M., HADDOX, M.K., GOLDBERG, N.D. (1972) Guanosine 3':5' cyclic monophosphate: A possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3024-3027
- 233- HAMMERLING, G., LEHMAN, V. y LUDERITZ, O. (1973) Structural studies on the heptose region of Salmonella lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 38, 453-458
- 234- HAMMERLING, G., LÜDERITZ, O. y WESTPHAL, O. (1970) Structural investigation on the core polysaccharide of Salmonella typhimurium and the mode of attachment of the O-specific chain. Eur. J. Biochem. 15, 48-56

- 235- HAMMERLING, G., LÜDERITZ, O. y WESTPHAL, O. (1971) Structural Investigations on the core polysaccharide of E. coli 0100 J. Biochem. 22, 331-344
- 236- HANK, J.H. (1948) The longevity of chick tissue cultures without removal of medium. J. Cell. Com. Physiol. 31, 335
- 237- HANNECART-POKORNI, DEKEGEL, D., y DEPUYDT, F. (1973) Macromolecular structure of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. Eur. J. Biochem. 38, 6-13
- 238- HANNECART-POKORNI, E., DEKEGEL, O., DEPUYDT, F. y DIRKX, J. (1970 a) Study of the structure of Shigella flexneri O antigen. I. Chemical degradation. Biochim. Biophys. Acta 201, 155-166
- 239- HANNECART-POKORNI, E., DEKEGEL, O., DEPUYDT, F. y DIRKX, J. (1970 b). Study of the structure of Shigella flexneri O antigen. II. Physicochemical aspect. Biochim. Biophys. Acta 201, 167-178
- 240- HARAN-GHERA, N. (1966) Int. J. Cancer 1, 81 Ref. MODRONI y SCHUMANN (1975b).
- 241- HARTLEY, J.W., ROWE, W.P., CAPPS, W.I. y HUEBNER, R.J. (1969) Isolation of naturally occurring viruses of the murine leukemia virus group in Tissue culture. J. Virol. 3, 126- 132
- 242- HARTLEY, J.L., ADAMS, G.A. y TORNABENE, T.G. (1974) Chemical and physical properties of lipopolysaccharide of Yersinia pestis. J. Bacteriol. 118, 848-854
- 243- HAUGHTON, G. y MAKELA, O. (1973) Suppression or augmentation of the antihapten response in mice by antibodies of different specificities. J. Exp. Med. 138, 103-116
- 244- HAWIGER, J., HAWIGER, A. y TIMMONS, S. (1975) Endotoxin-sensitive membrane component of human platelets. Nature 256, 125-127
- 245- HEATH, E.C. (1969). Complex polysaccharides. Ann. Rev. Biochem. 40, 29-56

- 246- HEATH, E.C. y GHALAMBOR, M.A. (1963) Octonate a constituent of cell wall lipopolysaccharide preparations obtained from E. coli. Biochim. Biophys. Res. Commun. 10, 340-345
- 247- HENSON, P.M. y SPIEGELBERG, H.L. (1973) Release of serotonin from human platelets induced by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses. J. Clin. Invest. 52, 1282-1288
- 248- HEPPEL, L.A. (1971) The concept of periplasmic enzymes p. 233-247. In L.I. Rothfield (ed) Structure and function of biological membranes. Academic Press. Inc. New York.
- 249- HERION, J.C., WALKER, R.I. HERRING, W.B. y PALMER, J.G. (1965) Effects of endotoxin and nitrogen mustard on leukocyte kinetics Blood 25, 522-540
- 250- HIBBS, Jr., J.B. (1973) Macrophage nonimmunology recognition. target cell factors related to contact inhibition. Science 180, 868-870
- 251- HICKMAN, J., y ASHWELL, G. (1966) Isolation of a bacterial lipopolysaccharide from Xanthomonas campestris containing 3-Acetamido-3,6-dideoxy-D-galactose and D-Rhamnose. J. Biol. Chem. 241, 1424-1428
- 252- HINCKLEY, A., MÜLLER, E., y ROTHFIELD, L. (1972) Reassembly of a membrane bound multienzyme system. I. Formation of a particle containing phosphatidylethanolamine , lipopolysaccharide and two glycosyltransferase enzymes. J. Biol. Chem. 247, 2623-2628
- 253- HIRSCH, M.S., PHILLIPS, S.M., SOLNIK, C., BLACK, P.H. y SCHWARTZ, R.S. y CARPENTER, C.B. (1972) Activation of Leukemia viruses by graft versus host reaction and mixed lymphocyte reactions In vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1069-1072
- 254- HIRSCHORN, R. (1974) Cyclic AMP, cell growth and the immune response, ed. W. Braun, L.M. Lichterstein, C.W. Parker, 45-54 New York: Springer.
- 255- HIRT, W.E. y VESTAL, J.R. (1975) Physical and chemical studies of Thiobacillus ferrooxidans lipopolysaccharides. J. Bacteriol. 123, 642-650

- 256- HO, M. (1964) Interferon-like viral inhibitor in rabbits after intravenous administration of endotoxin. *Science* 146, 1472-1474
- 257- HO, M., BREINIG, M.K., POSTIC, B., ARMSTRONG, J.A. (1970) Effect of pre-injections on the stimulation of interferon by a complexed polynucleotide, endotoxin and virus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 173, 680-693
- 258- HO, M., KE, Y.H. y ARMSTRONG, J.A. (1973) Mechanism of interferon induction by endotoxin. *The J. Infect. dis* 128 suppl. S220-S226
- 259- HO, M. y KONO, Y. (1965) Effect of actinomycin D on virus and endotoxin-induced interferon-like inhibitors in rabbits. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 53, 220-224
- 260- HOFMANN, M.K., WEISS, O., KOENIG, S., HIRST, J.A. y OETTGEN, H.F. (1975) Suppression and enhancement of the T cell-dependent production of antibody to SRBC in vitro by bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 114, 738-741
- 261- HOFSTAD, T., KRISTOFFERSEN, T., y SELVIG, K.A. (1972) Electron microscopy of endotoxic lipopolysaccharide from *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Sphaerophorus*. *Acta Path. Microbiol. Scand. Section B.* 80, 413-419
- 262- HOLLINGDALE, M.R. (1975) Isolation of lipopolysaccharide from the walls of *Micropolyspora faeni*: chemical composition and serological reactivity. *J. gen. Microbiol.* 86, 250-258
- 263- HOLME, T., LINDBERG, A.A., GAREGG, P.J., y ONN, T. (1968) Chemical composition of cell-wall polysaccharide of rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. gen. Microbiol.* 52, 45-54
- 264- HOMMA, J.Y. y ABE, C. (1972) Differences in chemical nature of the endotoxins derived from dissociants, types la, and sm, of *P. aeruginosa*, strain N10. *Jap. J. Exptl. Med.* 42, 23-34
- 265- HORN, R.G. (1973) Evidence for participation of granulocytes in the pathogenesis of the generalized Shwartzman reaction. *A Review. J. Infect. Dis.* 128, S134-S143

- 266- HORN, R.G.; COLLINGS, R.D. (1968) Studies on the pathogenesis of the generalized schwartzman reaction. The role of granulocytes. Lab. Inves. 18, 101-107
- 267- HOSHI, A., KANZAWA, F. KURETANI, K., HOMMA, J.Y., y ABE, C. (1972).
Antitumor activity of protein moiety of the Pseudomonas aeruginosa endotoxin. GANN, 63, 503-504.
- 268- HOWES, E.L.Jr. y MCKAY, D.G. (1975) Comparison of the ocular effects of circulating endotoxin and immune complexes: Role of vasoactive amines. J. Immunol. 114, 734-737
- 269- HSU, C.H. y CONRAD, H.E. (1971) Structural heterogeneity in the lipopolysaccharide from a rough strain of Salmonella anatum. Fed. Proc. 30, 1173
- 270- HUNIG, T., SCHIMPL, A y WECKER, E. (1974) Autoradiographic studies on the proliferation of antibody-producing cells in vitro. J. Exp. Med. 139, 754-760
- 271- HURVELL, B. (1973) Serological cross reactions between different Brucella species and Yersinia enterocolitica: Biological and chemical investigations of lipopolysaccharides from Brucella abortus and Yersinia enterocolitica type IX. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section B 81, 105-112
- 272- IGEL, H.J., HUEBNER, R.J., TURNER, H.C., KOTIN, P. y FALK, H.L. (1969) Mouse leukemia virus activation by chemical carcinogens. Science 166, 1624-1626
- 273- IKAWA, M., KOEPFLI, J.B., MUDD, S.G. y NIEMANN, C. (1953) An agent from E. coli causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. III. The component fatty acids of the phospholipid moiety. J. Am. Chem. Soc. 75, 1035-1038
- 274- JACKSON, S.W. y ZEY, P.N. (1973) Ultrastructure of lipopolysaccharide isolated from Treponema pallidum. J. Bacteriol. 114, 838-844

- 275- JACOBS, D.M. y MORRISON, D.C. (1975) Stimulation of a T-independent primary anti-hapten response in vitro by TNP-lipopolysaccharide (TNP-LPS) J. Immunol. 114, 360-364
- 276- JANDA, J. y WORK, E. (1971) A colorimetric estimation of lipopolysaccharides. FEBS letters 16, 343-345
- 277- JANN, B. y JANN, K. (1968) 2-amino-2,6-dideoxi-L-mannose (L-Rhamnosamine). Isolated from the lipopolysaccharide of E. coli 03:K2ab (L). Eur. J. Biochem. 5, 173-177
- 278- JENKINS, V.K., UPTON, A.C., WALBURG, H.E.Jr., y SATTERFIELD, L.C. (1971) Effects of microbial environment and endotoxin treatment on hemopoietic repopulation in sublethally irradiated mice. Texas Report on Biol & Med. Volume 29, 217-225
- 279- JENNINGS, H.J., HAWES, G.B., ADAMS, G.A. y KENNY, C.P. (1973) The chemical composition and serological reactions of lipopolysaccharides from Serogroups, A,B,X and Y Neisseria meningitidis. Can. J. Biochem. 51, 1347-1354
- 280- JERNE, N.K., HENRY, C. y NORDIN, A.A., FUJI, H, KOROS, A.M.C. y LEFKOVITS, I. (1974) Plaque forming cells: methodology and theory. Transplantation reviews 18, 130-191
- 281- JOHNSON, A.G., JACOBS, A., ABRAMS, G. y MERRITT, K. (1967) Comparative changes in the mouse spleen during immuno-stimulation or immunosuppression p. 214-220. En COTTIER, H. y N.D. ODORTCHENKO, R. SCHINDLER, and C.C. CONGDEN (Ed. Germinal centers in immune response. Springer-Verlag, New York.
- 282- JOHNSON, A.R., HUGLI, T.E., MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1975). Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a y C5a. Immunol. 28, 1067-1080
- 283- JOHNSON, H.M., SMITH, B.G. y BARON, S. (1975) Inhibition of the primary in vitro antibody response by interferon preparations. J. Immunol. 114, 403-409
- 284- JOHNSTON, J.H., JOHNSTON, R.J. y SIMMONS, D.A.R. (1968) The immunochemistry of Shigella flexneri O-antigens: A serological classification of rough mutants. Immunology 14, 657-663

- 285- JUHASZ, P.P., BENECKE, B.J. y SEIFART, K.H. (1972). Febs Letters, 27, 20. Ref. RONDA LAIN y Alonso (1973).
-
- 286- KAGNOFF, M.F., BILLINGS, P. y COHN, M. (1974) Functional characteristics of Peyer's patch lymphoid cells. II. Lipopolysaccharide is thymus dependent. J. exp. Med. 139, 407-426
- 287- KAMPSCHMIDT, R.F. y SCHULTZ, G.A. (1961) Hypofememia in rats following injection of bacterial endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106, 870-971
- 288- KANEGASAKI, S. y WRIGHT, A. (1970) Mechanism of polymerization of the Salmonella O-antigen; utilization of lipid-linked intermediates. Proc. Nat. Acad. Sci US 67, 951-958
- 289- KANESHIRO, T. y MARR, A.G. (1963) Hidroxy fatty acids of Azotobacter agilis. Biochim. Biophys. Acta 70, 271-277
- 290- KAPLAN, H.S. (1967) On the natural history of the murine leukemias: Presidential adress. Cancer Res. 27, 1325-1340
- 291- KAPP, J.A., PIERCE, C.W., SCHLOSSMAN, S. y BENACERRAF, B. (1974) Genetic control of immune responses in vitro. V. Stimulation of suppressor T cells in nonresponder mice by the terpolymer L-glutamic acid 60-L-alanine 30-L-tyrosine (GAT). J. exp. Med. 140, 648-695
- 292- KASAI, N. (1966) Chemical studies on the lipid component of endotoxin with special emphasis on its relation to biological activities. Ann. N.Y. Acad. Sci. 133, 486-507
- 293- KASAI, N. y NOWOTNY, A. (1967) Endotoxic glycolipid from a heptose-less mutant of Salmonella minnesota. J. Bacteriol. 94, 1824-1836
- 294- KAUFFMANN (1966) In "The Bacteriology of Enterobacteriaceae" Munksgaard, Copenhagen.
- 295- KAWAKAMI, M (1973). Antigenic determinant involved in hypersensitivity of infected mice to lipopolysaccharide of Salmonella. The J. Infect. Dis. 128, S. S246-S250.

- 296- KAY, R.E., WALWICK, E.R. y GIFFORD, C.K. (1964) Spectral changes in a cationic dye due to interaction with macromolecules. I. Behavior of dye alone in solution and the effect of added macromolecules. J. Phys. Chem. 68, 1896-1906
- 297- KE, Y.H., SINGER, S.H., POSTIC, B. y HO, M. (1966) Effect of puromycin on virus and endotoxin-induced interferon like inhibitors in rabbits. Proc. Soc. expt. Biol. Med. 121, 181-183
- 298- KEARNEY, J.F. y LAWTON, A.R. (1975). B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four mayor immunoglobulin classes. J. Immunol. 115, 671-676
- 299- KELETI, G., FEINGOLD, D.S. y YOUNGNER, J.S. (1974) Interferon induction in mice by lipopolysaccharide from Brucella abortus. Infect. Immun. 10, 282-283
- 300- KENT, J.L. y OSBORN, M.J. (1968) Properties of the O-specific hapten formed in vivo by mutant strains of Salmonella typhimurium. Biochemistry 7, 4396-4408
- 301- KEY, B.A., GRAY, G.W. y WILKINSON, S.G. (1970) The purification and chemical composition of the lipopolysaccharide of Pseudomonas alcaligenes. Biochem. J. 120, 559-566
- 302- KIMBALL, H.R., MELMON, K.L., WOLFF, S.M. (1972) Endotoxin-induced kinin production in man. Proc. Soc. Exp. Biol. med. 139, 1078-1082
- 303- KIMBALL, H.R., WILLIAMS, T.W. y WOLFF, S.M. (1968) Effect of bacterial endotoxin on experimental fungal infections. J. Immunol. 100, 24-33
- 304- KNOX, K.W., CULLEN, J. y WORK, E. (1967) An extracellular lipopolysaccharide phospholipid protein complex produced by E. coli grown under lysine-limiting conditions. Biochem. J 103, 192-201
- 305- KOELTZOW, D.E. y CONRAD, H.E. (1971) Structural heterogeneity in the lipopolysaccharide of Aerobacter aerogenes NCTC 243 Biochemistry 10, 214-224
- 306- KYOGOKU, Y, TSUBOI, M. y SHIMANOUCI, T. (1961) Nucleic Acids in deuterium oxide solution. Nature 189, 120-122

- 307- LABAR, F.E. y BALDWIN, R.L. (1962) A study by interference optics of sedimentation in short columns. J. Phys. Chem. 66, 1952-1966
- 308- LACAVE, C., ASSELINEAU, J., SERRE, A., ROUX, J. (1969) Comparaison de la composition chimique d'une fraction lipopolysaccharidique et d'une fraction polysaccharidique isolées de Bruce-lla melitensis. Eur. J. Biochem. 9, 189-198
- 309- LAGRANGE, P.H. y MacKANESE, G.B. (1975) Effects of bacterial lipopolysaccharide on the induction and expression of cell mediated immunity. II. Stimulation of the efferent arc. The J. Immunol. 114, 447-451
- 310- LAGRANGE, P.H. MacKANESE, G.B., MILLER, T.E. y PARDON, P. (1975) Effects of bacterial lipopolysaccharide on the induction and expression of cell mediated immunity. I. Depression of the afferent arc. J. Immunol. 114, 442-446
- 311- LANDY (1956) Increase resistance following administration of bacterial lipopolysaccharides. Ann. N.Y. Acad. Sci. 66, 292-303
- 312- LEE, L. y STETSON, C.A. (1965) En "The inflammatory process" (B.W. Zweifach, L. Grant y R.T. McCluskey, eds). pp. 791-817 Acad Press. New York.
- 313- LEIVE, L. (1965) Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 290-296
- 314- LEIVE, L., SHOVLIN, V.K. y MERGENHAGEN, S.E. (1968) Physical, chemical, and immunological properties of lipopolysaccharide released from E. coli by ethylenediaminetetracetate. J. Biol. chem. 243, 6384-6391
- 315- LE MINOR, L. (1963) Conversions antigéniques chez les Salmonella. IV. Acquisition du facteur 01 par des Salmonella des groupes R et T sous l'effet de la lysogenisation. Ann Inst. Pasteur 105, 879-896
- 316- LE MINOR, L. (1968) Conversions antigéniques chez les Salmonella. XI. Conversions dans le groupe N (0:30). Ann. Inst. Pasteur, 115, 62-67

- 317- LE MINOR, L. y STAUB, A.M. (1966) Etude sérologiques des facteurs 027 des Salmonella. Ann. Inst. Pasteur 110, 834-860
- 318- LENNOX, E.S. (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology 1, 190-206
- 319- LEONG, D., DIAZ, R. y WILSON, J.B. (1968) Identification of the toxic component of Brucella abortus endotoxin and its labeling with radioactive chromate. J. Bacteriol. 95, 612-617
- 320- LEONG, D., DIAZ, K., MILNER, J., RUDBACH, J. y WILSON, J.B. (1970) Some structural and biological properties of Brucella endotoxin. Infect. Immun. 1, 174-182
- 321- LEPO, J.E., y WYSS, O. (1974) Derepression of nitrogenase in Azotobacter. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 76-80
- 322- LERNER, R.G., GOLDSTEN, R., CUMMINGS, G. (1971) Stimulation of human leukocyte thromboplastic activity by endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 145-148
- 323- LINDBERG, A.A. y HELLERQUIST, C.G. (1971) Bacteriophage attachment sites, serological specificity, and chemical composition of the lipopolysaccharides of semirough and rough mutants of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 105, 57-64
- 324- LINDBERG, A.A., SVENSSON, S. (1975) Salmonella typhimurium mutations conferring resistance to felix O phage without loss of smooth character, phage attachment, and immunochemical & structural analyses of LPS. J. Gen. Microbiol. 87, 1-11
- 325- LINDSAY Shelagh, S., WHULER, B., SANDERSON, K.E. y COSTERTON, J.W. (1973) The release of alkaline phosphatase and of lipopolysaccharide during the growth of rough and smooth strains of Samonella typhimurium. Can. J. Microbiol. 19, 335-343
- 326- LIPINSKI, B., JELJASZEWICZ, J.A. (1969) A hypothesis for the pathogenesis of the generalized Shwartzman reaction. J. Infect. Dis. 120, 160-168
- 327- LOPES, J. y INISS, W.E. (1969) Electron microscopy of the effect of polymixin on E. coli lipopolysaccharide. J. Bacteriol. 100, 1128-1130

- 328- LOPES, J. y INISS, W.E. (1970) Electron microscopic study of lipopolysaccharide from an aviar strain of E. coli 018. J. Bacteriol. 103, 238-243
- 329- LOSICK, R. y ROBBINS, P.W. (1967) Mechanism of Σ^{15} conversion studied with a bacterial mutant. J. Mol. Biol. 30, 445-456
- 330- LOWY, D.R., ROWE, W.P., TEICH, N. y HARTLEY, J.W. (1971). Murine leukemia virus: High-frequency activation in vitro by 5-Iododeoxyuridine and 5-Bromodeoxyuridine. Science 174, 155-156
- 331- LÜDERITZ, O., GALANOS, C., LEHMANN, V., NURMINEN, M., RIETSCHER, E.T., ROSENFELDER, G., SIMON, M. y WESTPHAL, O. (1973) Lipid A: Chemical structure & Biological activity. J. Infect. dis. 128 S, S 17- S.29
- 332- LÜDERITZ, O., GALANOS, C., RISSE, H.J., RUSCHMANN, E., SCHLECHT, S., SCHMIDT, G., SCHUTE-HOLTHAUSEN, H., WHEAT, R. y WESTPHAL, O. (1966 a). Structural relationships of Salmonella O and R antigens Ann. N.Y. Acad. Sci. 133, 349-374
- 333- LÜDERITZ, O.J. GMEINER, B., KICKHÖFEN, H., MAYER, H. WESTPHAL, O. y WHEAT, R.W. (1968 b). Identification of D-mannosamine and quinovosamine in Salmonella and related bacteria. J. Bacteriol. 95, 490-494
- 334- LÜDERITZ, O., JANN, K. y WHEAT, R. (1968 a) Somatic and capsular antigens of gram-negative bacteria. Comp. Biochem. 26A, 105-228
- 335- LÜDERITZ, O., STAUB, A.M. y WESTPHAL, O. (1966 b) Immunochemistry of O and R antigens of Salmonella and related enterobacteriaceae. Bacteriol. Rev. 30, 192-255
- 336- LUDLUM, D.B. y WARNER, R.C. (1965) Equilibrium centrifugation in Cesium sulfate solutions. J. Biol. Chem. 240, 2961-2965
- 337- MacGREGOR, R.R., SHEAGREN, J.N. y WOLFF, S.M. (1969) Endotoxin-induced modification of plasmodium berghei infection in mice J. Immunol. 102, 131-139
- 338- MACKIE, T.J. y MCCARTNEY, J.E. (1960) En Handbook of bacteriology, p. 308. Ed. por Cruickshank, R. Edinburgh y London E. y L. Liwingstone Ltd.

- 339- MacLENNAN, I. y HARDING, B. (1970) The role of immunoglobulin in lymphocyte mediated cell damage, in vitro. II. The mechanism of target cell damage by lymphoid cells from immunized rats. *Immunology* 18, 405-412
- 340- MacLENNAN, I. y HARDING, B. (1974) Non-T cytotoxicity in vitro p. 347-350. En L. Brent y J. Holborrow (ed) *Progress in Immunol.* II. vol. 3. North-Holland, Amsterdam.
- 341- MAKELA, P.H. y SARVAS, M. (1969) En "Structure et effets biologiques des produits bacteriens provenant de germes gram negatifs" Coll. Paris. Oct. 1967 p. 201 C.N.R.S., Paris.
- 342- MANDELKERN, L., KRIGBAUM, W.R., SCHERAGE, H.A. y FLORY, P.J. (1952) Sedimentation behaviour of flexible chain molecules: polyisobutylene. *J. Chem. Phys.* 20, 1392-1397
- 343- MARGHERITA, S.S. y FRIEDMAN, H. (1965) Induction of nospecific resistance by endotoxin in unresponsivemice. *J. Bacteriol.* 89, 277-280
- 344- MARTIN, E.L. y MacLEOD, R.A. (1971) Isolation and chemical composition of the cytoplasmic membrane of a gram-negative bacterium. *J. Bacteriol.* 105, 1160-1167
- 345- MAYBERRY-CARSON, K.J., LANGWORTHY, T.A., MAYBERRY, W.R. y SMITH, P.F. (1974) A new class of lipopolysaccharide from Thermoplasma acidophilum. *Biochim. Biophys. Acta* 360, 217-229
- 346- MAYBERRY-CARSON, K.J., ROTH, I.L. y SMITH, P.F. (1975) Ultrastructure of lipopolysaccharide from Thermoplasma acidophilum. *J. Bacteriol.* 121, 700-703
- 347- McELHANEY, R.N., DEGIER, J. y VAN DER NEUT-KOOK, E.C.M. (1973). The effect of alterations in fatty acid composition and cholesterol content on the non-electrolyte permeability of Acholeplasma laidlawii B cells and derived liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 500-512
- 348- McINTIRE, F.C., BARLOW, G.H., SIEVERT, H.W., FINLEY, R.A. y YOO, A.L. (1969) Studies on a lipopolysaccharide from E. coli Heterogeneity and mechanism of reversible inactivation by sodium deoxycholate. *Biochemistry* 8, 4063-4067
- 349- McINTIRE, F.C., SIEVERT, H.W., BARLOW, G.H., FINLEY, R.A. y LEE, A.Y. (1967) Chemical, physical and biological properties of a lipopolysaccharide from E. coli K-235. *Biochemistry* 6, 2363-2372

- 350- MCKAY, D.G. y WONG, T.C. (1963). The effect of bacterial endotoxin on the placenta of the rat. *Amer. J. Pathol.* 42, 357-377
- 351- McMASTER, P.D. y FRANZL, R.E. (1968) The primary immune response in mice. II. Cellular responses of lymphoid tissue accompanying the enhancement or complete suppression of antibody formation by a bacterial endotoxin. *J. Exp. Med.* 127, 1109-1126
- 352- MECHANIC, R.C., FREI, E., LANDY, M., SMITH, W.W. (1962). Quantitative studies of human leukocytic and febrile response to single and repeated doses of purified bacterial endotoxin. *J. Clin. Invest.* 41, 162-172
- 353- MELA, L., BACALZO, L.V.Jr., MILLER, L.D. (1971). Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. *Am. J. Physiol.* 220, 571-577
- 354- MELCHERS, F. y ANDERSSON, J. (1973) Synthesis, surface deposition and secretion of immunoglobulin M in bone marrow derived lymphocytes before and after mitogenic stimulation. *Transpl. Rev.* 14, 76
- 355- MELCHERS, F. y ANDERSSON, J. (1974 a) IgM in bone marrow-derived lymphocytes changes in synthesis, turnover and secretion and in numbers of molecules on the surface of B cells after mitogenic stimulation. *Eur. J. Immun.* 4, 181-188
- 356- MELCHERS, F., y ANDERSSON, J. (1974 b) Early changes in immunoglobulin M synthesis after mitogenic stimulation of bone marrow derived lymphocytes. *Biochem.* 13, 4645-4653
- 357- MERGENHAGEN, S.E., BLADEN, H.A. y HSU, K.C. (1966) Electron microscopic localization of endotoxic lipopolysaccharide in gram-negative organism. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 133, 279-291
- 358- MERGENHAGEN, S.E., SNYDERMAN, R., GEWURZ, H., SHIN, H.S. (1969) Significance of complement on the mechanism of action of endotoxin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 50, 37-77
- 359- MERGENHAGEN, S.E., SNYDERMAN, R. y PHILLIPS, J.K. (1973) Activation of complement by endotoxin. *J. Infect. Dis.* 128 S, S86-S 90
- 360- MICHAL, F. (1969) D receptor for serotonin on blood platelets. *Nature* 221, 1253-1254

- 361- MIHICH, E., WESTPHAL, O, LÜDERITZ, O. y NETER, E. (1961) The tumor necrotizing effect of lipoid A component of E. coli endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 107, 816-819
- 362- MILES, A.A., PIRIE, N.W. (1939) Brit. J. Expt. Pathol 20, 83
LUDERITZ, O, WESTPHAL, O, STAUB, A.M. y NIKAIDO, H. (1971) Microbial Toxins IV, Academic Press.
- 363- MILLER, R.L., REICHGOTT, M.J. y MELMON, K.L. (1973) Biochemical mechanism of generation of bradykinin by endotoxin. J. Infect. Dis. 128, S 144- 156
- 364- MILNER, K.C. (1973) Patterns of tolerance to endotoxin. J. Infect Dis. 128 S , S 237-S 245
- 365- MILNER, K.C., ANACKER, R.L., KUKUSHI, K., HASKINS, W.T., LANDY, M., MALMGREN, B., y RIBI, E. (1963). Symposium on relationship of structure of microorganisms to their immunological properties. III. Structure and biological properties of surface antigens from gram-negative bacteria. Bacteriol. Rev. 27, 352-368
- 366- MITCHELL, P. (1961) Approaches to the analysis of specific membrane transport, p. 581-603. In T. W. Goodwin and O. Lindberg (ed), Biological structure and function, vol. 2. Academic Press. Inc. New York.
- 367- MÖLLER, G. (1972) Immunological tolerance. Effect of antigen on different cell populations. Transpl. Rev. 8, 3-136
- 368- MÖLLER, G.J., ANDERSSON, J. y SJÖBERG, O. (1972) Lipopolysaccharides can convert heterologous red cells into thymus independent antigen. Cell Immunol. 4, 416-424
- 369- MÖLLER, E. y SJÖBERG, O. (1972) Antigen-binding cells in immune and tolerant animals. Transplant. Rev. 8, 26-49
- 370- MÖLLER, G., SJÖBERG, O. y ANDERSSON, J. (1973) Immunogenicity, tolerogenicity and mitogenicity of lipopolysaccharides. J. Infect. Dis. 128 S, S 52-S 56
- 371- MORGAN, W.T.J. (1937) Studies in immunochemistry. II. The isolation from B. dysenteriae (Shiga). Biochem. J. 31, 2003-2021

- 373- MORGAN, W.T.J. y PARTRIDGE, S.M. (1942) An examination of the O antigen complex of Bact. typhosum. Brit. J. Exptl. Pathol. 23, 151-165
- 373- MORONI, C. y SCHUMANN, G. (1975 b) Lipopolysaccharide induces C-type virus in short term cultures of BALB/C spleen cells. Nature 254, 60-61
- 374- MORONI, C., SCHUMANN, G., ROBERT-GUROFF, M., SUTER, E.R. y MARTIN, D. (1975 a) Induction of endogenous murine C-type virus in spleen cell cultures treated with mitogens and 5-bromo-2'-deoxyuridine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 535-538
- 375- MORRISON, D.C. y LEIVE, L. (1975) Fractions of lipopolysaccharide from E. coli 0111: B4 prepared by two extraction procedures. J. Biol. Chem. 250, 2911-2919
- 376- MORRISON, W.R. y SMITH, L.M. (1964) J. Lipid. Res. 5, 600-608. Ref. LUDERITZ y cols (1973).
- 377- MUHLRADT, P.F. y GOLECKI, J.R. (1975) Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of Salmonella typhimurium. Eur. J. Biochem. 51, 343-352
- 378- MUHLRADT, P.F., MENZEL, J., GOLECKI, J.R., SPETH, V. (1974) Lateral mobility and surface density of lipopolysaccharide in the outer membrane of Salmonella typhimurium. Eur. J. Biochem. 43, 533-539
- 379- MÜLLER, E., HINCKLEY, A. y ROTHFIELD, L. (1972) Studies of phospholipid-requiring bacterial enzymes. III. Purification and properties of uridine diphosphate glucose: lipopolysaccharide glucosyltransferase I. J. Biol. Chem. 247, 2614-2622
- 380- MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1971) Progr. Immunol. 1, 553. Ref. MÜLLER-EBERHARD (1975)
- 381- MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1972) Harvey Lect. 66, 75. Ref. MÜLLER-EBERHARD (1975)

- 382- MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1975) Complement. Ann. Rev. Biochem. 44, 697-724
- 383- MÜLLER-EBERHARD, H.J., LEPOW, I.H. (1965) C1 esterase effect on activity and physicochemical properties of the fourth component of complement. J. Exp. Med. 121, 819-833
- 384- MYERS, R.D. RUDY, T.A. y YAKSH, T.L. (1974) Fever produced by endotoxin injected to the hypothalamus of the monkey and its antagonism by salicylate. J. Physiol. 243. 167-193
- 385- NAIDE, Y., NIKAIDO, H., MAKELA, P.H. WILKINSON, R.G. y STOCKER, B.A.D. (1965) Semirough strains of Salmonella. Proc. Nat. Acad. Sc. US 53, 147-153
- 386- NAKANO, J. y PRANCAN, A.V. (1973) Metabolic degradation of prostaglandin E1 in the lung and kidney of rats in endotoxin shock. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 144, 506-508
- 387- NAKANO, M., UCHIYAMA, T. y SAITO, K. (1973) Adjuvant effect of endotoxin; antibody response to sheep erythrocytes in mice after transfer of syngeneic lymphoid cells treated with bacterial lipopolysaccharide in vitro. J. Immunol. 110. 408-413
- 388- NANNINGA, N. (1970) Ultrastructure of the cell envelope of E. coli B after freeze-etching. J. Bacteriol. 101, 297-303
- 389- NELSON, D.A. (1973) Production by stimulated macrophages of factor depressing lymphocyte transformation. Nature (London) 246, 306-307
- 390- NESBITT, J.A., III, LENNARZ, W.J. (1965) Comparison of lipids and lipopolysaccharide from the bacillary an L forms of Proteus P18. J. Bacteriol. 89, 1020-1025
- 391- NETER, E. (1956). Bacterial hemagglutination and hemolysis Bact. Rev. 20, 1660188.
- 392- NETER, E. (1969) Endotoxins and the immune response. Current Topics Microbiol. Immunol. 47, 82-124
- 393- NETER, E., ANZAI, E.A., GORZYNSKI, A., NOWOTNY, A. y WESTPHAL, O. (1960) Effects of lipoid A component of E. coli endotoxin on dermal reactivity of rabbits to epinephrine. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 103, 783-786
- 394- NETER, E., WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., GORZYNSKI, E.A. y EICHENBERGER, E.J. (1956) Studies of enterobacterial lipopolysaccharides. Effects of heat and chemicals on erythrocyte modifying, antigenic, toxic and pyrogenic properties. J. Immunol. 76, 377-385

- 395- NETER, E. WHANG, H.Y. y MAYER, H. (1973) Immunogenicity and antigenicity of endotoxic lipopolysaccharides: reversible effects of temperature on immunogenicity. J. Infect. dis. . 128 S, S 56-S 60
- 396- NEUGEBAUER, T. (1943) Ann. Phys, 42, 509. Ref. HANNELART-POKORNI y cols (1970b)
- 397- NEWBURGER, P.E., HAMAOKA, T. y KATZ, D.H. (1974) Potentiation of helper T cell function in IgE antibody responses by bacterial lipopolysaccharide (LPS). J. Immunol. 113, 825-829
- 398- NIEMETZ, J., FANI, K. (1971) Role of leukocytes in blood coagulation and the generalized Shwartzman reaction. Nature (New Biology) 232, 247-248
- 399- NIKAIDO, H. (1969) Structure of cell wall lipopolysaccharide from Salmonella tiphimurium. I. Linkage between O side chains and R core. J. Biol. Chem. 244, 2835-2845
- 400- NIMMICH, W. (1970) Occurrence of 3-O-methyl-mannose in lipopolysaccharids of Klebsiella and E. coli. Biochim. Biophys. Acta 215, 189-191
- 401- NOWOTNY, A. (1961) Chemical structure of a phosphomucolipid and its occurrence in some strains of Salmonella. J. Am. Chem. Soc. 83, 501-503
- 402- NOWOTNY, A. (1966) Heterogeneity of endotoxic bacterial lipopolysaccharides revealed by ion-exchange column chromatography. Nature 210, 278-280
- 403- NOWOTNY, A. (1969) Basic exercises in immunochemistry. A laboratory manual. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. New York.
- 404- NOWOTNY, A. (1971). Naturwissenschaften, 58, 397-409. Ref. TOMASULO y cols (1975).
WILZBACH, J.E. (1957). J. Am. Chem. Soc. 79, 1013. Ref. TOMASULO y cols (1975).
- 405- NOWOTNY, A., CINDY, K.R., NEALE, N.L., NOWOTNY, A.M., RADVANY, R., THOMAS, S.P. y TRIPODI, D.J. (1966) Relation of structure to function in bacterial O-antigens. IV Fractionating of the components. Ann. N.Y. Acad. Sci. 133, 586-603
- 406- NOWOTNY, A.M., THOMAS, S., DURON, O.S. y NOWOTNY, A. (1963) Relation of structure to function in bacterial O antigens. I. Isolation methods. J. Bacteriol. 85, 418-426

- 407- ODORTCHENKO, N.D., SCHINDLER, R. y CONGDEN, C.C. (ed.) Germinal centers in immune response. Springer-Verlag., New York
- 408- OHASHI, M. y YAMAKAWA, T. (1973) J. Lipid Res. 14, 698-700.
LÜDERITZ y cols, (1973)
- 409- OKUDA, S., SATO, M., UCHIYAMA, H. y TAKAHASHI, H. (1975) Degradation of lipopolysaccharide of E. coli by a hot phenol extraction. J. gen. Appl. Microbiol. 3, 169-184
- 410- OLINS, A.L. y WARNER, R.C. (1967) Physicochemical studies on a lipopolysaccharide from the cell wall of Azotobacter vinelandii. J. Biol. Chem. 242, 4994-5001
- 411- O'NEILL, G.L. y TODD, J.P. (1961) Extraction of nucleic acid-free lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria. Nature 190, 344-345
- 412- ORNELLAS, E.P., SANFILIPPO, F. y SCOTT, D.W. (1974) Cellular events in tolerance. IV. The effect of a graft-versus-host reaction and endotoxin on hapten and carrier specific tolerance. Eur. J. Immunol. 4, 587-591
- 413- OROSZLAN, S.I. y MORA, P.T. (1963) Dissociation and reconstitution of an endotoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 345-349
- 414- ØRSKOV, F., ØRSKOV, I, JANN, B. y JANN, K. (1963) Acidic polysaccharide antigens of a new type from E. coli capsules. Nature 200, 144-146
- 415- ØRSKOV, F., ØRSKOV, I, JANN, B., JANN, K., MÜLLER-SEITZ, E. y WESTPHAL, O. (1967) Immunochemistry of E. coli O antigens Acta Pathol. Microbiol. Scand. 71, 339-358
- 416- OSBORN, M.J. (1963) Studies on the gram-negative cell wall. I. Evidence for the role of 2- keto-3-deoxyoctanate in the lipopolysaccharide of Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. US 50, 499-506
- 417- OSBORN, M.J. (1968) Biochemical characterization of mutants of Salmonella typhimurium lacking glucosyl or galactosyl lipopolysaccharide transferases. Nature 217, 957-960

- 418- OSBORN, M.J. (1969) Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Ann. Rev. Biochem.* 38, 501-538
- 419- OSBORN, M.J. (1971) The role of membranes in the synthesis of macromolecules, p. 343-400. En: L. Rothfield (ed) *Structure and function of biological membranes*. Academic Press Inc. New York
- 420- OSBORN, M.J., GANDER, J.E., PARISI, E. y CARSON, J. (1972 a) Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem.* 247, 3962-3972
- 421- OSBORN, M.J., GANDER, J.E., y PARISI, E. (1972 b) Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Site of synthesis of lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 247 3973-3986
- 422- OSBORN, M.J. y WEINER, I.M. (1968) Biosynthesis of a Bacterial Lipopolysaccharide. VI. Mechanism of incorporation of abequose into the O-antigen of Salmonella typhimurium. *J. Biol. Chem.* 243, 2631-2639
- 423- OSBORN, M.J. y YUAN TZE-YUEN, R. (1968) Biosynthesis of Bacterial lipopolysaccharide. VII Enzymatic formation of the first intermediate in biosynthesis of the O-antigen of Salmonella typhimurium. *J. Biol. Chem.* 243, 5145-5152
- 424- OUCHTERLONY, Ø (1967) En: *Handbook of experimental immunology* p. 655. Ed. Weir.
- 425- OZATO, K., ADDLER, W.H. y EBER, J.D. (1975) Synergism of bacterial lipopolysaccharides and concanavalin A in the activation of thymic lymphocytes. *Cellular Immunology* 17, 532-541
- 426- PALMER, J.W. y GERLOUGH, T.D. (1940) A simple method for preparing antigenic substances from the typhoid bacillus. *Science* 92, 155-156
- 427- PANUM, P.L. (1859) *Schmidts' Jahrbucher* 101, 213 Ref. NOWOTNY, A (1971) *Naturwissenschaften* 58, 397-409.
- 428- PASTAN, I.H., JOHNSON, G.S. y ANDERSON, W.B. (1975) Role of cyclic nucleotides in growth control. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 491-522
- 429- PATE, J.L. y ORDAL, E.J. (1967) The fine structure of Chondrococcus columnaris. III. The surface layers of Chondrococcus columnaris. *J. Cell. Biol.* 35, 37-51

- 430- PATTERSON, L.T., HARPER, J.M. y HIGGINBOTHAM, R.D. (1968) Association of C-reactive protein and circulating leukocytes with resistance to Staphylococcus aureus infection in endotoxin treated mice and rabbits. J. Bacteriol. 95, 1375-1379
- 431- PATTERSON, L.T. y HIGGINBOTHAM, R.D. (1965) Mouse C-reactive protein and endotoxin-induced resistance. J. Bacteriol. 90, 1520-1524
- 432- PEAVY, D.L., ADLER, W.H., SHANDS, J.W. y SMITH, R.T. (1974). Selective effects of mitogens on subpopulations of mouse lymphoid cells. Cell Immunol. 11, 86-98
- 433- PEAVY, D.L., SHANDS, J.W., ADLER, W.H.Jr. y SMITH, R.T. (1973) Mitogenicity of bacterial endotoxins: characterization of the mitogenic principle. J. Immunol. 111, 352-357
- 434- PEREZ UREÑA, M.T., ESPINOSA, M., LOPEZ, R. y PORTOLES, A. (1972) Immunodepressive effects, produced by some extracellular metabolites from P. aeruginosa strains. Zentr. Bakt. Par. Infek. Hyg. 127, 134-139
- 435- PHILLIPS, J.K., SNYDERMAN, R. y MERGENHAGEN, S.E. (1972) Activation of complement by endotoxin: a role for γ 2-globulin, C1, C4 y C2 in the consumption of terminal complement components by endotoxin-coated erithrocytes. J. Immunol. 109, 334-341
- 436- PILCH, Y.H., RAMMING, K.P. y DECKERS, P.J. (1973) Studies in mediation of tumor immunity with "immune" RNA. Methods in Cancer Res. IX, 195-254
- 437- PILLEMER, L, BLUM, L., LEPOW, I.H., ROSS, O.A., TODD, E.W. y WARDLAW, A.C. (1954) The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin and its role in immune phenomena. Science 120, 279-285
- 438- PILLEMER, L., SCHOENBERG, M.D., BLUM, L. y WURZ, L. (1955) Properdin system and immunity. II. Interaction of the properdin system with polysaccharides. Science 122, 545-549
- 439- POSTIC, B., DEANGELIS, C., BREINIG, M.K. y HO, M. (1966) Effect of temperature on the induction of interferons by endotoxin and virus. J. Bacteriol. 91, 1277-1281

- 440- POSTIC, B., DeANGELIS, C., BREINIG, M.K. y HO, M. (1967) Effects of cortisol y adrenalectomy on induction of interferon by endotoxin. Proc. Soc. Esp. Biol. Med. 125, 89-92
- 441- PREHM, P., STIRM, S., JANN, B., y JANN, K. (1975) Cell-wall lipopolysaccharide from E. coli B. Eur. J. Biochem. 56, 41-55
- 442- PRUUL, H. y REYNOLDS, B.L. (1972) Interaction of complement and polymyxin with gram-negative bacteria. Infect. Immunity 6, 709-717
- 443- PRYJMA, J., HUMPHREY, J.H. y KLAUS, G.G.B. (1974) C3 activation and T-independent B cell stimulation. Nature (London) 252, 505-507
- 444- QUINTANS, J. y LEFKOVITS, I. (1974). Clonal expansion of lipopolysaccharide stimulated B lymphocytes. J. Immunol. 113, 1373-1376
- 445- RAISTRICK, H. y TOPLEY, W.W.C. (1934) Brit. J. Exp. Pathol 15, 113. Ref. NOWOTNY, A (1971) Naturwissenschaften 58, 397-409.
- 446- RALPH, P. (1973) Retention of lymphocyte characteristics by myelomas and θ^+ -lymphomas: sensitivity to cortisol and phytohemagglutinin. J. Immunol. 110, 1470-1475
- 447- RALPH, P. y NAKOINZ, I. (1974) Lipopolysaccharide inhibit lymphosarcoma cells of bone marrow origin. Nature 249, 49-51
- 448- RAFF, R.A. y WHEAT, R.W. (1968) Carbohydrate composition of the phenol-soluble lipopolysaccharides of Citrobacter freundii. J. Bacteriol. 95, 2035-2043
- 449- RASMUSSEN, L.E., JORDAN, G.W., STEVENS, D.A. y MERIGAN, T.C. (1974) Lymphocyte interferon production and transformation after herpes simplex infections in humans. J. Immunol. 112, 728-736
- 450- RATNOFF, O.D. (1969) Some relationships among hemostasis, fibrinolytic phenomena, immunity, and the inflammatory response. Adv. Immunol. 10, 145-227

- 451- RAYNAUD, M. y DIGEON, M. (1949) Sur une nouvelle toxine du bacille typhique extraite des formes rough. C.R. Acad. Sci. (Paris) 229, 564-566
- 452- RAYNAUD, M., KOUZNETZOVA, B., NAVARRO, M.J., CHERMANN, J.C., DIGEON, M. y PETITPREZ, A. (1973) A common antigenic constituent in various purified Salmonella endotoxins. J. Infect. Dis. 128, Supplm. S 35-S 42
- 453- REDFEARN, M.S. (1960) An immunochemical study of antigens of Brucella extracted by the Westphal technique. Ph.D. Thesis, Univ. Wisconsin. Madison
- 454- REED, L.J. y MUENCH, H. (1938) Am J. Hyg. 27, 495. Ref. KNOX y cols (1967)
- 455- REED, N.D., MANNING, J.K. y RUDBACH, J.A. (1973) Immunologic responses of mice to lipopolysaccharide from E. coli. J. Infect. Dis. 128 S, S 70-S 74
- 456- REED, W.P. y LUCAS, Z.J. (1975) Cytotoxic activity of lymphocytes I. Role of saluble toxin in macrophage inhibited cultures of tumor cells. J. Immunol. 115, 395-404
- 457- RENOUX, G., RENOUX, M. y TINELLI, R. (1973) Phenol-water fractions from smooth Brucella abortus and Brucella melitensis: Immunochemical analysis and biologic behavior. J. Infect. Dis. 127, 139-148
- 458- REYNOLDS, B.L. y PRUUL, (1971). Protective role of smooth lipopolysaccharide in the serum bactericidal reaction. Infect. Immunity 4, 764-771
- 459- RHODES, J. (1973) Receptor for monomeric IgM on guinea pig splenic macrophages. Nature (London) 243, 527-528
- 460- RIBI, E., ANACKER, R.L., BROWN, R., HASKINS, W.T., MALMGREN, B., MILNER, K.C. y RUDBACH, J.A. (1966) Reaction of endotoxin and surfactants. I. Physical and Biological properties of endotoxin treated with sodium deoxycholate. J. Bacteriol. 92, 1493-1509

- 461- RIBI, E., ANACKER, R.L., FUKUSHI, K., HASKINS, W.T., LANDY, M. y MILNER, K.C. (1964) Relationship of chemical composition to biological activity. En ' Bacterial Endotoxins" (M. Landy y W. Braun, eds) pp. 16-28. Rutgers Univ. Press. New Brunswick, New Jersey.
- 462- RIBI, E., HASKINS, W.T., LANDY, M. y MILNER, K.C. (1961) Preparation and host reactive properties of endotoxin with low content of nitrogen and lipid. J. Exptl. Med. 114, 647-663
- 463- RIBI, E., MILNER, K.C. y PERRINE, T.D. (1959) Endotoxic antigenic fractions from the cell wall of *Salmonella enteritidis*. Methods for separation and some biologic activities. J. Immunol. 82, 75-84
- 464- RIETSCHEL, E.T., GOTTERT, H., LÜDERITZ, O. y WESTPHAL, O. (1972) Nature and linkages of the fatty acids present in the lipid A component of *Salmonella* lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 28, 166-173
- 465- RIPPE, D.F. y BERRY, L.J. (1973) Immunological quantitation of hepatic tryptophan oxygenase in endotoxin poisoned mice. Infect. & Immun. 8, 534-539
- 466- RITTER, J., LOHMANN-MATTHES, M.L. SONNTAG, H.G. y FISCHER, H. (1975) Requirement for macrophages in lipopolysaccharide-stimulated mixed thymocyte cultures. Cell. Immunol. 16, 153-161
- 467- ROBBINS, P.W. y UCHIDA, T. (1965) Chemical and macromolecular structure of O-antigens from *salmonella anatum* strains carrying mutants of Bacteriophage ϕ^{15} . J. Biol. Chem. 240, 375-383
- 468- ROELANTS, G.E., GOODMAN, J.W. y McDEVITT, H.O. (1971) Binding of a polypeptide antigen to ribonucleic acid from macrophage, Hela and *Escherichia coli* cells. J. Immunol 106, 1222-1226.
- 469- ROGERS, H.J. (1970) Bacterial growth and the cell envelope. Bacteriol. Rev. 34, 194-204
- 470- ROGERS, H.J. y PERKINS, H.R. (1968) Cell walls and membranes, E. y F.N. Spon Ltd. London.
- 471- ROGERS, S.W., GILLELAND, H.E. y EAGON, R.G. (1969) Characterization of a protein-lipopolysaccharide complex released from cell walls of *P. aeruginosa* by ethylenediamine tetraacetic acid. Can. J. Microbiol. 15, 743-748

- 472- ROJAS-CORONA, R.R., SKARNES, R., TAMAKUMA, S. y FINE, J. (1969) The Limulus coagulation test for endotoxin, a comparison with other assay methods. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132 599-601
- 473- ROMANOWSKA, E. (1970) Sepharose gel filtration method of purification of lipopolysaccharides. An. Biochem. 33, 383-389
- 474- RONDA, E. y ALONSO, M.L. (1973) Interferon levels in the presence of rifamycin molecules. Progress in Chemoth. vol. II, 1005-1009
- 475- ROONEY, S.A. y GOLDFINE, H. (1972) Isolation and characterization of 2-keto-3-deoxyoctonate-lipid A from an heptose-deficient mutant of E. coli. J. Bacteriol. 111, 531-541
- 476- ROSEN, B.P., y HACKETTE, S.L. (1972) Effects of fatty acid substitution on the release of enzymes by osmotic shock. J. Bacteriol. 110, 1181-1189
- 477- ROSENFELDER, G., LÜDERITZ, O. y WESTPHAL, O. (1974) Composition of lipopolysaccharides from Myxococcus fulvus and other fruiting and non-fruiting Myxobacteria. Eur. J. Biochem. 44, 411-420
- 478- ROTHFIELD, L., TAKESHITA, M., PEARLMAN, M. y HORNE, R.W. (1966) Role of phospholipids in the enzymatic synthesis of the bacterial cell envelope. Fed. PROC. 25, 1495-1502
- 479- ROTHFIELD, L. y HORNE, R.W. (1967) Reassociation of purified lipopolysaccharide and phospholipid of the bacterial cell envelope: electron microscopic and monolayer studies. J. Bacteriol. 93, 1705-1721
- 480- ROTTER, V. y TRAININ, N. (1974) Thymus cell population exerting a regulatory function in the immune response of mice to polyvinyl-pyrrolidone. Cell. Immunol. 13, 76-86
- 481- ROWE, W.P., HARTLEY, J.W., LANDER, M.R. PUGH, W.E. y TEICH, N. (1971) Noninfectious AKR mouse embryo cell lines in which each cell has the capacity to be activated to produce infectious murine leukemia virus. Virology 46, 866-876

- 482- ROWLEY, D. (1955) Stimulation of natural immunity to *E. coli* infections. Observations on mice. *Lancet* 1, 232-234
- 483- ROWLEY, D, HOWARD, J.G., y JENKIN, C.R. (1956). The fate of ³² P-labelled bacterial lipopolysaccharide in laboratory animals. *The Lancet*, 1, 366-367.
- 484- RUBIN, M.S., SWISLOCKI, N.I. y SONENBERG, M.S. (1973) Alteration of liver plasma membrane protein conformation by Bovine growth hormone in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 157, 252-259
- 485- RUBIO, N. y LOPEZ, R. (1971) Purification of *P. aeruginosa* endotoxin by gel filtration on Sepharose 4B. *J. Chromatogr.* 57, 148-150
- 486- RUBIO, N. y LOPEZ, R. (1972) Purification of *P. aeruginosa* endotoxin by membrane partition chromatography. *Appl. Microbiol.* 23, 211-213
- 487- RUBIO, N. y PORTOLES, A (1972) Immunosuppressive activity of the *P.aeruginosa* endotoxin on a lysozyme anti-lysozyme system. *Zentr. Bakt. Parasit.* 127, 313-317
- 488- RUBIO, N., PORTOLES, A. y LOPEZ, R. (1973) Immuno-physical properties of *P. aeruginosa* protein-lipopolysaccharide complex treated with surfactants. *Arch. Microbiol.* 94, 149-158
- 489- RUDBACH, J.A. (1971) Molecular immunogenicity of bacterial lipopolysaccharide antigens: Establishing a quantitative system. *J. Immunol.* 106, 993-1001
- 490- RUDBACH, J.A., ANACKER, R.L., HASKINS, W.T., JOHNSON, A.G., MILNER, K.C. y RIBI, E. (1966) Physical aspects of reversible inactivation of endotoxin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 133, 629-643
- 491- RUDBACH, J.A. y MILNER, K.C. (1968) Reaction of endotoxin and surfactants. III. Effect of sodium lauryl sulfate on the structure and pyrogenicity of endotoxin. *Can. J. Microbiol.* 14, 1173-1178
- 492- RUDBACH, J.A., MILNER, K.C. y RIBI, E. (1967) Hybrid formation between bacterial endotoxins. *J. Expt. Med.* 126, 63-70
- 493- RUDDY, S. y AUSTEN, K.F. (1971) C3b inactivator of man. II. Fragments produced by C3b inactivator cleavage of cell bound or fluid phase C3b. *J. Immunol.* 107, 742-750

- 494- RUSSA, R. y LORKIEWICZ, Z. (1974). Fatty acids present in the lipopolysaccharide of Rhizobium trifolii. J. Bacteriol. 119, 771-775
- 495- RYAN, J.M. y CONRAD, H.E. (1974) Structural heterogeneity in the lipopolysaccharide of Salmonella newington. Arch. Biochem. Biophys. 162, 530-535
- 496 SAMUELSSON, K., LINDBERG, B. y BRUBAKER, R.R. (1974) Structure of O-specific side chains of lipopolysaccharides from Yersinia pseudotuberculosis. J. Bacteriol. 117, 1010-1016
- 497- SANDERSON, K.E., MacALISTER, T.J., COSTERTON, J.W. y CHENG, K.J. (1974) Permeability of lipopolysaccharide-deficient (rough) mutants of Salmonella typhimurium to antibiotics, lysozyme and other agents. Can. J. Microbiol. 20, 1135-1145
- 498- SCHACHMAN, H.K. (1957) Ultracentrifugation, diffusion, and viscometry. In: S.P. Colowick y N.O. Kaplan (ed) Methods in Enzymology, vol. 4, p. 32-103 Academic Press, Inc. New York
- 499- SCHACHMAN, H.K. (1959) Ultracentrifugation in Biochemistry. Academic Press. Inc. New York
- 500- SCHEID, M.P., HOFFMANN, M.K., KOMURO, K., HAMMERLING, U, ABBOT, J., BOYSE, E.A., COHEN, G.H., HOOPER, J.A., SCHULOF, R.S. y GOLDSTEIN, A.L. (1973) Differentiation of T cells induced by preparations from thymus and by nonthymic agents. The determined state of the precursor cell. J. Exp. Med. 138, 1027-1032
- 501- SCHIMPL, A. y WECKER, E. (1972) Replacement of T cell function by a T cell product. Nature (New Biol) 237, 15
- 502- SCHLOSSHARDT, J. (1960) Zentralb. Bakteriол. Parasitenkd. Infektion Hyg. Abt. I Orig. 177, 176-185. Ref. LUDERITZ, O, WESTPHALD, O, STAUB, A.M. , y NIKAIIDO, H. (1971). Microbial Toxins IV Academic Press.
- 503- SCHMIDTKE, J.R. y NAJARIAN, J.S. (1975) Synergistic effects on DNA synthesis of phytohemagglutinin or concanavalin A and lipopolysaccharide in human peripheral blood lymphocytes. J. Immunol. 114, 742-746

- 504- SCHNAITMAN, C.A. (1970) Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of E. coli. J. Bacteriol. 104, 890-901
- 505- SCHNAITMAN, C. A. (1971) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of E. coli. J. Bacteriol. 108, 553-563
- 506- SCHRADER, J.W. (1973) Mechanism of activation of the bone marrow derived lymphocyte. III. A distinction between a macrophage-produced triggering signal and the amplifying effect on triggered B lymphocytes of allogenic interactions. J. Exp. Med. 138, 1466-1480
- 507- SCHRADER, J.W. (1974) The mechanism of bone marrow-derived (B) lymphocyte activation. II. A second signal for antigen-specific activation provided by flagellin and lipopolysaccharide. Eur. J. Immunol. 4, 20-24
- 508- SCHRAMM, G., WESTPHAL, O, y LÜDERITZ, O. (1952) Über bakterielle Reizstoffe. III. Mitt: Physikalisch-chemisches Verhalten eines hochgereinigten colipyrogens. Z. Naturforsch 7 b, 594-598
- SCHWAB, J.H. (1975) Suppression of the immune response by microorganisms. Bact. Rev. 39, 121-143
- 510- SELIGMAN, A.M., SHEAR, M.J., LEITER, J. y SWEET, B. (1948). J. Natl. Cancer. Inst. 9, 13-18. Ref. TOMASULO y cols (1975).
- 511- SHANDS, J.W. (1966) Localization of somatic antigen on gram-negative bacteria using ferritin antibody conjugates. Ann. N.Y. Acad. Sci. 133, 292-298
- 512- SHANDS, J.W., Jr., y GRAHAM, J.A. (1969) En"Structure et effects biologiques de produits bacteriens provenant de bacilles gram-négatifs" Colloques du C.N.R.S., Paris 174, 25
- 513- SHANDS, J.W., Jr., GRAHAM, J.A. y NATH, K. (1967) The morphologic structure of isolated bacterial lipopolysaccharide. J. Mol. Biol. 25, 15-21
- 514- SHANDS, J.W., Jr., MILLER, V. y MARTIN, H. (1969) The hypoglycemic activity of endotoxin. I. Occurrence in animals hyperactive to endotoxin. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 130, 413-417

- 515- SHANDS, Jr., J.W., PEAVY, D.L., GORMUS, B.J. y McGRAW, J. (1974) In vitro and in vivo effects of endotoxin on mouse peritoneal cells. *Infect. Immunity* 9, 106-112
- 516- SHANDS, J.W., Jr., PEAVY, D.L., y SMITH, R.T. (1973) Differential morphology of mouse spleen cells stimulated in vitro by endotoxin, phytohemagglutinin, pokeweed mitogen and Staphylococcal enterotoxin B. *Am. J. Pathol.* 70, 1-24
- 517- SHEID, M.P. (1973) Differentiation of T cells induced by preparations from thymus and by nonthymic agents. *J. exp. Med.* 138, 1027-1032
- 518- SHUGAR, D. (1952) The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 8, 302-309
- 519- SIMMONS, D.A.R. (1971) Immunochemistry of *Shigella flexneri* O-antigens: a study of structural and Genetic Aspects of the Biosynthesis of cell-surface antigens. *Bacteriol. Rev.* 35, 117-148
- 520- SINGER, I., KIMBLE, E.T., III y RITTS, R.E., Jr. (1964) Alterations of the host-parasite relationship by administration of endotoxin to mice with infections of typanosomes. *J. Infect. dis.* 114, 243-248
- 521- SINGER, S.J. y NICOLSON, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731
- 522- SKIDMORE, B.J., CHILLER, J.M., MORRISON, D.C. y WEIGLE, W.O. (1975 a) Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant and immunogenic activities. *J. Immunol.* 114, 770-775
- 523- SKIDMORE, B.J., MORRISON, D.C., CHILLER, J.M. y WEIGLE, W.O. (1975 b) Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS). II. The unresponsiveness of C3H/HeJ mouse spleen cells to LPS-induced mitogenesis is dependent on the method used to extract LPS. *J. Exp. Med.* 142, 1488-1508
- 524- SMITH, E.J. (1964) The isolation and characterization of 2-amino-2,6-dideoxy-D-glucosa (D-quinovosamina) from a bacterial polysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 593-597

- 525- SMITH, W.C. y BALLOU, C.E. (1973) 6-methylglucose containing lipopolysaccharide of Mycobacterium phlei. Locations of the neutral and acidic acyl groups. J. Biol. Chem. 248, 7118-7125
- 526- SNELL, E.S. y ATKINS, E. (1967) Interactions of gram-negative bacterial endotoxin with rabbit blood in vitro. Amer. J. Physiol. 212, 1103-1112
- 527- SNELL, E.S. y ATKINS, E. (1968) En "The biological basis of medicine (E.E. Bittar, ed.) vol. 2, pp. 397-419 Acad. Press. New York.
- 528- SNYDERMAN, R., GEWURZ, H., MERGENHAGEN, S.E. y JENSEN, J. (1971) Effect of C4 depletion on the utilization of the terminal components of guinea-pig complement by endotoxin. Nature (New Biol) 231, 152-154
- 529- SNYDERMAN, R. y PIKE, M.C. (1975) Interaction of complex polysaccharides with the complement system. Effect of calcium depletion on terminal component consumption. Infect. Immunol. 11, 273-279
- 530- SPIELVOGEL, A.R. (1967) An ultrastructural study of the mechanisms of platelet endotoxin interaction. J. exp. Med. 126, 235-250
- 531- SPINK, W.W., DAVIS, R.B., POTTER, R. y CHARTRAND, S. (1964) The initial stage of canine endotoxin shock as an expression of anaphylactic shock: studies on complement titers and plasma histamine concentrations. J. clin. Invest. 43, 696-704
- 532- SPITNAGEL, J.K. y ALLISON, A.C. (1970) Mode of action of adjuvants: effects on antibody responses to macrophage associated bovine serum albumin. J. Immunol. 104, 128-139
- 533- SPITZER, J.A. (1974) Endotoxin-induced alterations in isolated fat-cells: effect on norepinephrine-stimulated lipolysis and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate accumulation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145, 186-191
- 534- SPITZER, J.A., KOVACH, A.G.B., ROSELL, S., SANDOR, P., SPITZER, J.J. y STORCK, R. (1973) En "Advances in Experimental Medicine and Biology" (A.G.B. Kovach, H.B., Stoner y J.J. Spitzer, eds). vol. 33, p. 337 Plenum, New York.

- 535- SPRINGER, G.F., ADYE, J.C., BEZKOROVAINY, A., JIRGENSONS, B. (1974) Properties and activity of the lipopolysaccharide receptor from human erythrocytes. *Biochemistry* 13, 1379-1389
- 536- SPRINGER, G.F., ADYE, J.C., BEZKOROVAINY, A. y MURTHY, J.R. (1973) Functional aspects and nature of the lipopolysaccharide receptor of human erythrocytes. *J. Infect. Dis.* 128 S, S 202-212
- 537- STAUB, A.M. (1965) Somatic degraded polysaccharide of gram negative bacteria. En" *Methods in Carbohydrate Chemistry*" (R.L. Whistler y M.L. Wolfrom, eds), vol. V., pp. 93-95 Academic Press, New York
- 538- STAUB, A.M. y BAGDIAN, G. (1966) Etudes immunochemiques sur les Salmonella XII. Analyse immunologique des facteurs 27 A, 27 B et 27 D. *Ann. Inst. Pasteur*, 110, 849-860
- 539- STEAD, A., MAIN, J.S., WARD, M.E. y WATT, P.J. (1975) Studies on lipopolysaccharide isolated from strains of Neisseria gonorrhoeae. *J. gen. Microbiol.* 88, 123-131
- 540- STITZEL, A.E. y SPITZER, R.E. (1974) The utilization of properdin in the alternative pathway of complement activation: Isolation of properdin convertase. *J. Immunol.* 112, 56-62
- 541- SUGIYAMA, T., SMITH, P.F., LANGWORTHY, T.A. y MAYBERRY, W.R. (1974) Immunological analysis of glycolipids and lipopolysaccharides derived from various mycoplasmas. *Infect. & Immun.* 10, 1273-1279
- 542- SULTZER, B.M. (1972) Genetic control of host responses to endotoxin. *Infect. Immun.* 5, 107-113
- 543- SUZUKI, N. (1969) Isolation of DL-fucosamine from Pseudomonas aeruginosa NIO. *Biochim. Biophys. Acta* 177, 371-373
- 544- SVET-MOLDAVSKY, G.J., NEMIROVSKAYA, B.M. y OSIPOVA, T.U. (1974) Interferonogenicity and antigen Recognition. *Nature* 247, 205-206
- 545- SVEDBERG, T. y PEDERSEN, K.O. (1940) The ultracentrifuge, p. 40-41. Oxford. Univ. Press. New York

- 546- TARCSAY, L., WANG, C.S., LI, S.C. y ALAUPOVIC, P. (1973) Composition and structure of the O-specific side chain of endotoxin from Serratia marcescens 08. Biochemistry 12, 1953-1955
- 547- TEH, H. y PAETKAU, V. (1974) Biphasic effect of cyclic AMP on an immune response. Nature 250, 505-507
- 548- TENNENT, D.M. y OTT, W.H. (1952) Quantitative assay of pyrogens by the febrile-response in rabbits. International Congress on Analytical Chemistry. 77, 643-652
- 549- THEOFILOPOULUS, A.N., BOKISCH, V.A. y DIXON, F.J. (1974) Receptor for soluble C3 and C3b on human lymphoblastoid (RAJI) cells. Properties and biological significance. J. Exp. Med. 139, 696-711
- 550- THOMAS, L. (1956) The role of epinephrine in the reactions produced by the endotoxins of gram-negative bacteria. I. Hemorrhagic Necrosis produced by epinephrine in the skin of endotoxin treated rabbits. J. Expt. Med. 104, 865-880
- 551- THOMAS, L. (1964) Possible role of leucocyte granules in the Schwartzman and Arthus reactions. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115, 235-240
- 552- THOMAS, L. y GOOD, R.A. (1952) Studies on the generalized Schwartzman reaction. I. General observations concerning the phenomena. J. exp. Med. 96, 605-624
- 553- TOMASULO, P.A., MARCH, S.C. y LEVIN, J. (1975). Tritation of endotoxin. Biochim. Biochim. Biophys. Acta. 400, 399-406.
- 554- TREMBLAY, G.Y., DANIELS, M.J. y SCHAECHTER, M. (1969). Isolation of a cell membrane-DNA-nascent RNA complex in bacteria. J. Mol. Biol. 40, 65-76
- 555- TRENKNER, E. (1974) The use of allogeneic T lymphocytes and bacterial lipopolysaccharide to induce immune responses to monovalent haptens in vitro. J. Immun. 113, 918-924
- 556- TRENTIN, J.J. (1967) Cross-reacting antigens and neoantigens. Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- 557- TSANG, J.C., WANG, C.S. y ALAUPOVIC, P. (1974) Degradative effect of phenol on endotoxin and lipopolysaccharide preparations from Serratia marcescens. J. Bacteriol. 117, 786-795

- 558- TSUBOI, M (1968) Bull. Chem. Soc. Japan, 41, 1821. Ref. HIGUCHI, S., TSUBOI, M. y IITAKA, y (1969). Biopolymers, 7, 909-916.
- 559- TYTELL, A.A., LAMPSON, G.P., FIELD, A.K. y HILLEMANN, M.R. (1967) Inducers of interferon and host resistance. III. Double-stranded RNA from reovirus type 3 virions (REO 3-RNA) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 1719-1722
- 560- UCHIDA, T., ROBBINS, P.W. y LURIA, S.E. (1963) Analysis of the serologic determinant groups of the Salmonella E-group O-antigens. Biochemistry 2, 663-668
- 561- UHR, J.W. y MÖLLER, G. (1968) Regulatory effect of antibody on the immune response. Adv. Immunol. 8, 81-128
- 562- UNANUE, E.R. (1972) The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Adv. Immunol. 15, 95-175
- 563- UNANUE, E.R., ASKONAS, B.A. y ALLISON, A.C. (1969) A role of macrophages in the stimulation of immune responses by adjuvants. J. Immunol. 103, 71-78
- 564- VALLOTA, E.H. GÖTZE, O, SPIEGELBERG, H.L. FORRISTAL, J., WEST, C.D. y MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1974) A serum factor in chronic hypocomplementemic nephritis distinct from immunoglobulins and activatin the alternate pathway of complement. J. Exp. Med. 139, 1249-1261.
- 565- VAN DEN BERG, K.J. y BETEL, I. (1974) Co-relation of early changes in amino acid transport and DNA synthesis in stimulated lymphocytes. Cell. Immunol. 10, 319-323
- 566- VAN HOLDE, K.E. (1971) Physical biochemistry. Ed. Prentice Hall Inc. New Jersey.
- 567- VESTAL, J.R. y LUNDGREN, D.G. y MILNER, K.C. (1973) Toxic and immunological differences among lipopolysaccharides from Thiobacillus ferrooxidans grown autotrophically and heterotrophically. Can. J. Microbiol. 19, 1335-1339
- 568- VOLK, W.A. (1966) Cell wall lipopolysaccharide from Xanthomonas species. J. Bacteriol. 91, 39-42

- 569- VOLK, W.A. (1968 a) Isolation of D-glactouronic acid 1-phosphate from hydrolysates of cell wall lipopolysaccharide extracted from Xanthomonas campestris. J. Bacteriol. 95, 782-786
- 570- VOLK, W.A. (1968 b) Quantitative assay of polysaccharide components obtained from cell wall lipopolysaccharides of Xanthomonas species. J. Bacteriol. 95, 980-982
- 571- VON ESCHEN, K.B. y RUDBACH, J.A. (1976) Antibody responses of mice to alkaline detoxified lipopolysaccharide. J. Immunol. 116, 8-11
- 572- WAGNER, R.R., SNYDER, R.M., HOOK, E.W y LUTTRELL, C.N. (1959) Effect of bacterial endotoxin on resistance of mice to viral encephalitides including comparative studies of the interference phenomenon. J. Immun. 83, 87-98
- 573- WALLEN, W.C., DEAN, J.H. y LUCAS, D.O. (1973). Interferon and the cellular immune response. Separation of interferon-producing cells from DNA-synthetic cells. Cell. Immunol. 6, 110-122.
- 574- WANG, C.S. y ALAUPOVIC, P. (1973) Composition and structure of the O-specific side chain of endotoxin from Serratia marcescens Bizio. Biochemistry 12, 309-315
- 575- WANG, C.S., BURNS, R.K. y ALAUPOVIC, P. (1974) Isolation and composition of oligosaccharide cores from endotoxins of two Serratia marcescens strains. J. Bacteriol. 120, 990-993
- 576- WARNER, R.C. (1958) Physical properties of crystalline "fluorokinase". Arch. Biochem. Biophys. 78, 494-496
- 577- WATSON, J.R., EPSTEIN, R., NAKOINZ, I. y RALPH, P. (1973 b) The role of humoral factors in the initiation of in vitro primary immune-responses. II. Effects of lymphocyte mitogens. J. Immunol. 110, 43-52
- 578- WATSON, J. y RIBLET, R. (1975). Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to LPS. J. Immunol. 114, 325-328.

- 579- WATSON, J.R., TRENNER, E. y COHN, M. (1973 a) The use of bacterial lipopolysaccharides to show that two signals are required for the induction of antibody synthesis. J. Exp. Med. 138, 699-714
- 580- WEBER, T.H., SKOOG, V.T., MATTSSON, A. y LINDAHL-KIESSLING, K. (1974) Kinetics of lymphocyte stimulation in vitro by non-specific mitogens. Exp. Cell. Res. 85, 351-361
- 581- WECKESSER, J. y DREWS, G. (1974 b) The lipopolysaccharides (O-antigens) of Rhodopseudomonas viridis. Arch. Microbiol. 101, 233-245
- 582- WECKESSER, J., DREWS, G., FROMME, I. y MAYER, H. (1973 a) Composition of the lipopolysaccharides of Rhodopseudomonas palustris strains. Arch. Mikrobiol. 92, 123-138
- 583- WECKESSER, J., KATZ, A., DREWS, G., MAYER, H. y FROMME, I. (1974 a). Lipopolysaccharide containing L-acofriose in the filamentous blue-green alga Anabaena variabilis. J. Bacteriol. 120, 672-678
- 584- WECKESSER, J., DREWS, G. y FROMME, I. (1972) Chemical analysis of and degradation studies on the cell wall lipopolysaccharide of Rhodopseudomonas capsulata. J. Bacteriol. 109, 1106-1113
- 585- WEHRLI, W. NUESCH, J. , KNUSEL, F., y STAEHELIN, M (1968). Action of rifamycins on RNA polymerase. Biochim. Biophys. Acta, 157, 215-217.
- 586- WEIDEL, W., FRANK, H. y MARTIN, H.H. (1960) The rigid layer of the cell wall of Escherichia coli strain B. J. gen. Microbiol. 22, 158-166
- 587- WEINER, E., y LEVANON, D. (1968) The in vitro interaction between bacterial lipopolysaccharide and differentiation monocytes. Lab. Invest. 19, 584-590
- 588- WEINER, I.M., HIGUCHI, I., ROTHFIELD, L., SALTMARSHANDREW, M., OSBORN, M.J. y HORECKER, B.L. (1965) Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide, V. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of the O-antigen groups of Salmonella typhimurium. Proc. Nat. Acad. Sci. US 54, 228-235

- 589- WEINER, R. y ZWEIFACH, B.W. (1966) Influence of E. coli endotoxin on serotonin contractions of the rabbit aortic strip. Proc. Soc. Exp. Biol. (NY) 123, 937-939
- 590- WEISE, G., DREWS, G., JANN, B. y JANN, K. (1970) Identification and analysis of a lipopolysaccharide in cell walls of the blue green alga Anacystis nidulans. Arch. Mikrobiol. 71, 89-98
- 591- WEISER, M.M. y ROTHFIELD, L. (1968) The Reassociation of lipopolysaccharide, Phospholipid and Transferase Enzymes of the bacterial cell envelope isolation of binary and ternary complexes. J. Biol. Chem. 243, 1320-1328
- 592- WESTPHAL, O., y JANN, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides: Extraction with Phenol-water and further applications of the procedure. En "Methods in carbohydrate Chemistry" (R.L. Whistler y M.L. Wolfrom, eds). vol. V, pp. 83-91. Academic Press, New York
- 593- WESTPHAL, O., KAUFFMANN, F., LUDERITZ, O. y STIERLIN, H. (1960) Zentr. Bakteriolog. I. Orig. 179, 336. Ref. LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., STAUB, A.M. y NIKAIDO, H. (1971). Microbial Toxins IV. Academic Press.
- 594- WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., y BISTER, F. (1952) Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch 7 b 148-155
- 595- WHANG, H.W., LÜDERITZ, O., WESTPHAL, O. y NETER, E. (1965) Inhibition by lipoid A of formation of antibodies against common antigen of enterobacteriaceae. Proc. Soc. Esp. Biol Med. 120, 371-374
- 596- WHITE, D.A., ALBRIGHT, F.R., LENNARZ, W.J. y SCHNAITMAN, C.A. (1971) Distribution of phospholipid-synthesizing enzymes in the wall and membrane subfractions of the envelope of E. coli. Biochim. Biophys. Acta 249, 636-642
- 597- WHITE, D.A., LENNARZ, W.J. y SCHANAITMAN, C.A. (1972) Distribution of lipids in the wall and cell envelope of E. coli J. Bacteriol. 109, 686-690

- 598- WHITFIELD, J.F. y MacMANUS, J.P. (1972) Calcium-mediated effects of cyclic GMP on the stimulation of thymocyte proliferation by prostaglandin E₁. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 818-824
- 599- WHITFIELD, J.F., MacMANUS, J.P., FRANKS, D.J. y YOUNDALE, T. (1971) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 453-457. Ref. PASTAN y cols (1975).
- 600- WILKINSON, S.G. (1968) Glycosyl diglycerides from Pseudomonas rubescens. Biochim. Biophys. Acta 164, 148-156
- 601- WILKINSON, S.G. y CARBY, K.A. (1971) Amino-sugars in the cell walls of Pseudomonas species. J. gen. Microbiol. 66, 221-227
- 602- WILKINSON, S.G. y GALBRAITH, L. (1975 a) Studies of the lipopolysaccharides from P. aeruginosa. Eur. J. Biochem. 52, 331-343
- 603- WILKINSON, S.G., GALBRAITH, L. y LIGHTFOOT, G.A. (1973) Cell walls, lipids, and lipopolysaccharides of Pseudomonas species. Eur. J. Biochem. 33, 158-174
- 604- WILKINSON, S.G. y WELBOURN, (1975 b) 2-amino-2-deoxy-galacturonic acid in lipopolysaccharides from P. aeruginosa. Biochem. J. 149, 783-784
- 605- WILSON, L.A. y SPITZNAGEL, J.K. (1968) Molecular and structural damage to E. coli produced by antibody, complement, and lysozyme systems. J. Bacteriol. 96, 1339-1349
- 606- WILTON, J.M., ROSENSTREICH, D.L. y OPPENHEIM, J.J. (1975) Activation of guinea pig macrophages by bacterial lipopolysaccharide requires bone marrow-derived lymphocytes. J. Immunol. 114, 388-393
- 607- WINTER, C.A., RISLEY, E.A. y NUSS, G.W. (1962) Carrageenin-induced Edema in Hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 544-547
- 608- WOLFF, S.M. (1973) Biological effects of bacterial endotoxins in man. J. Infect. Dis. 128 S, S 259- S 264

- 609- WOLFF, S.M. y BENNET, J.V. (1974) New Engl. J. Med. 291, 733-734. Ref. HAWIGER y cols (1975)
- 610- WOLFF, J. y COOK, G.H. (1975 a) Endotoxic lipopolysaccharides stimulate steroidogenesis and adenylate cyclase in adrenal tumor cells. Biochim. Biophys. Acta 413, 291-297
- 611- WOLFF, J. y COOK, G.H. (1975 b) Change effects in the activation of adenylate cyclase. J. Biol. Chem. 250, 6897-6903
- 612- WOLFF, S.M., RUBENSTEIN, M., MULHOLLAND, J.H. y ALLING, D.W. (1965) Comparison of hematologic and febrile response to endotoxin in man. Blood 26, 190-201
- 613- WRIGHT, A., DANKERT, M., FENNESSEY, P. y ROBBINS, P.W. (1967) Characterization of a polyisoprenoid compound functional in O-antigen biosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sc. US 57, 1798-1803
- 614- WRIGHT, A., DANKERT, M. y ROBBINS, P.W. (1965) Evidence for an intermediate stage in the biosynthesis of the Salmonella O-antigen. Proc. Nat. Acad. Sci. US 54, 235-241
- 615- WRIGHT, L.J., KIMBALL, H.R. y WOLFF, S.M. (1969) Alterations in host responses to experimental Candida albicans infections by bacterial endotoxin. J. Immunol. 103, 1276-1282
- 616- YANG, C., y NOWOTNY, A. (1974) Effect of endotoxin on tumor resistance in mice. Infect. & Immun. 9, 95-100
- 617- YEN-WATSON, B. y KUSHNER, I. (1974) Rabbit CRP response to endotoxin administration: Dose-response relationship and kinetics. Proc. Soc. Exp. Biol & Med. 146, 1132-1136
- 618- YOUNGNER, J.S. (1970) Interferon production by nonviral stimuli of microbial origin. J. gen. Physiol. 56 (suppl) 25-40
- 619- YOUNGNER, J.S., FEINGOLD, D.S. y CHEN, J.K. (1973) Involvement of a chemical moiety of bacterial lipopolysaccharide in production of interferon in animal. J. Infect. Dis. 128 (Suppl) 227-231
- 620- YOUNGNER, J.S., STINEBRING, W.R. y TAUBE, S.E. (1965) Influence of inhibitors of protein synthesis on interferon formation in mice. Virology 27, 541-550

- 621- YPHANTIS, D.A. (1964) Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. *Biochemistry* 3, 297-317
- 622- ZEN-BAR, I., NACHTIGAL, D. y FELDMAN, M. (1975) Mechanisms in immune tolerance. II. Specific immunosuppression by T lymphocytes of B memory cells in mice made tolerant to HSA. *Cell. Immunol.* 17, 202-214
- 623- ZEY, P., y JACKSON, S. (1973). Conditions that affect the colorimetric analysis of lipopolysaccharide from Escherichia coli and Treponema pallidum. *App. Microb.* 26, 129-133.
- 624- ZIMMERMAN, T.S. y MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1971) Blood coagulation initiation by a complement-mediated pathway. *J. exp. Med.* 134, 1601-1607
- 625- ZWADYK, P.Jr. y SNYDER, I.S. (1973) Effects of endotoxin on hepatic glycogen metabolism in vitro. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 142, 299-302